

Ana Micaela Neves Santos

Análise toxicológica de canabinóides sintéticos em contexto forense

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2018

Ana Micaela Neves Santos

Análise toxicológica de canabinóides sintéticos em contexto forense

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2018

Ana Micaela Neves Santos

Análise toxicológica de canabinóides sintéticos em contexto forense

Trabalho original realizado por:

Ana Micaela Neves Santos

Projeto de pós-graduação apresentado à
Universidade Fernando Pessoa como parte
dos requisitos para obtenção de grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob
orientação da Professora Doutora Márcia
Cláudia Dias de Carvalho.

Resumo

Os canabinóides sintéticos são um grupo de substâncias psicoativas que emergiram no mercado das drogas em meados da década de 2000, desenhadas com a finalidade de mimetizar os efeitos psicoativos do delta-9-tetrahidrocanabinol (THC), canabinóide responsável pela maioria dos efeitos psicoativos da canábis. Estes produtos são vendidos como misturas de ervas para fumar, sob uma variedade de nomes como “K2” e “Spice”. No entanto, apesar de algumas semelhanças farmacológicas à canábis, estas drogas não devem ser confundidas. Os canabinóides sintéticos são substâncias muito potentes, que podem ter consequências graves e potencialmente letais. Desta forma, a determinação dos canabinóides sintéticos e dos seus metabolitos em amostras biológicas assume grande interesse em Toxicologia Forense. O presente trabalho pretendeu promover o conhecimento dos efeitos fisiológicos, farmacológicos e toxicológicos dos canabinóides sintéticos, e destacar as implicações forenses e médico-legais do uso destas drogas. Para o desenvolvimento do trabalho, foi realizada primeiramente uma revisão da literatura sobre as características principais dos canabinóides sintéticos, incluindo a prevalência do seu consumo, formas de administração, aspetos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, efeitos fisiológicos e toxicidade aguda e a longo prazo. Posteriormente, são referidos vários aspetos relevantes em contexto forense, nomeadamente as matrizes biológicas usadas na sua deteção, os procedimentos de colheita e preservação dessas amostras, as metodologias empregues na análise toxicológica e as potenciais áreas de aplicação dessas análises.

Palavras-chave: Canabinóides sintéticos; “spice”; toxicidade; forense; toxicologia

Abstract

Synthetic cannabinoids are a group of psychoactive substances which arose in the drugs market in the mid-2000's, designed to mimic the psychoactive effects of the delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), the cannabinoid responsible for most of the psychoactive properties of cannabis. These products are sold as herbs mixtures to smoke, under a variety of names such as "K2" and "Spice". However, despite of some pharmacological similarities to cannabis, these drugs should not be confounded. Synthetic cannabinoids are very powerful substances, which may have serious and potentially lethal consequences. Therefore, the determination of synthetic cannabinoids and their metabolites in biological specimens assumes a great interest in Forensic Toxicology. The present work intended to promote the awareness of physiological, pharmacological and toxicological effects of the synthetic cannabinoids, and to highlight the forensic and medical-legal implications of these drugs usage. Firstly, to the development of this study, a literature review on main characteristics of synthetic cannabinoids was held, including the prevalence of its consumption, forms of administration, pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects, physiological effects and acute and long-term toxicity. Subsequently, several aspects relevant in forensic context are referred, namely the biological matrices used in its detection, sampling procedures and the preservation of those samples, methodologies applied in the toxicological analysis and potential application areas of those analyses.

Keywords: Synthetic cannabinoids; spice; toxicity; forensics; toxicology

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Márcia Cláudia Dias de Carvalho, por me ter transmitido o gosto pela área da Toxicologia, por toda a sua disponibilidade e pelo apoio na escrita desta dissertação.

A todos os professores que fizeram parte do meu percurso na Universidade Fernando Pessoa.

Aos meus amigos, por sempre acreditarem em mim.

À minha família, irmão, avós, tios e primos, por sempre me terem apoiado, manifestado felicidade pela minha escolha ao envergar por mais um curso universitário e por demonstrarem a confiança que em mim depositam.

Aos meus pais, por me terem dado a oportunidade de seguir o meu sonho, pelo apoio em todos os momentos menos bons, por confiarem nas minhas capacidades e por sempre me incentivarem a ir mais além. A ti mãe, obrigada por não me teres deixado desistir deste sonho e por todo o apoio neste último ano de curso.

Ao Pedro, um agradecimento especial por toda a paciência que manifestou ao longo destes anos, por todo o carinho, por apoiar as minhas decisões e estar sempre do meu lado.

Índice Geral

Resumo	v
Abstract.....	vi
Agradecimentos	vii
Índice Geral	viii
Índice de figuras	x
Índice de tabelas	xii
Lista de abreviaturas	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAIS E MÉTODOS	3
III. CANNABIS SATIVA E CANABINÓIDES	4
3.1. Fitocanabinóides	5
3.2. O sistema endocanabinóide	6
3.3. Canabinóides endógenos	11
IV. CANABINÓIDES SINTÉTICOS	12
4.1. História	12
4.2. Formas de consumo	14
4.3. Prevalência.....	14
4.4. Estrutura química.....	15
4.5. Toxicocinética	19
4.5.1. Absorção	19
4.5.2. Distribuição	19
4.5.3. Metabolismo	20
4.5.4. Excreção	23
4.6. Efeitos tóxicos	24
4.7. Dependência	26
4.8. Tratamento de intoxicações agudas	27
V. CANABINÓIDES SINTÉTICOS EM TOXICOLOGIA FORENSE	28
5.1. A importância dos canabinóides sintéticos em contexto forense	28
5.2. Investigação toxicológica	28
5.2.1. Recolha, envio, conservação e armazenamento da amostra.....	29

5.2.2. Redistribuição <i>post mortem</i>	30
5.2.3. Estabilidade química e metabólica	30
5.2.4. Matrizes biológicas empregues na análise de canabinóides sintéticos ...	33
5.2.4.1. Urina	33
5.2.4.2. Sangue	34
5.2.4.3. Saliva	35
5.2.4.4. Cabelo	35
5.2.5. Preparação da amostra	36
5.2.5.1. Hidrólise enzimática	36
5.2.5.2. Extração líquido-líquido	37
5.2.5.3. Extração em fase sólida	38
5.2.5.4. Extração líquido-líquido assistida por <i>salting-out</i>	39
5.2.6. Métodos de análise	39
5.2.6.1. Métodos de rastreio	40
5.2.6.2. Métodos de confirmação	42
5.2.6.2.1. Cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa	42
5.2.6.2.2. Cromatografia líquida acoplada a espetrometria de massa	43
5.2.6.2.3. Cromatografia líquida acoplada a espetrometria de massa de alta resolução	44
5.3. Estudo de casos forenses	44
VI. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	48
VII. BIBLIOGRAFIA	50

Índice de figuras

Figura 1. Estruturas químicas do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), do canabidiol e do canabinol (adaptado de Bow e Rimoldi, 2016; Mechoulam e Hanus, 2000).	6
Figura 2. Classificação de agonistas dos recetores canabinóides (adaptado de Pertwee, 2006).	8
Figura 3. Mecanismo de ação dos canabinóides nos terminais pré e pós-sinápticos. 1) Os neurotransmissores do neurónio pré-sináptico ativam o neurónio pós-sináptico; 2) o neurónio pós-sináptico ao ser estimulado liberta endocanabinóides; 3) o ligando CB ₁ endógeno dissemina-se e liga-se ao recetor CB ₁ na fenda pré-sináptica; 4) o recetor CB ₁ estimula a proteína G, levando à inibição da libertação dos neurotransmissores; 5) os canabinóides sintéticos ativam diretamente os recetores CB ₁ , mimetizando os efeitos dos endocanabinóides (adaptado de Niaz et al., 2017).	10
Figura 4. Estruturas químicas da anandamida e do 2-araquidonilglicerol (2-GA) (adaptado de Gao e Wang, 2018; Deng e van der Stelt, 2017).	11
Figura 5. Pacotes contendo canabinóides sintéticos comercializados sob diversas designações (Newsweek, 2017).	13
Figura 6. Estrutura geral dos canabinóides sintéticos (OEDT, 2017), sendo R1 a cauda ligada ao núcleo (Le Boisselier et al., 2016).	15
Figura 7. Estrutura química de alguns canabinóides sintéticos pertencentes à primeira geração de canabinóides sintéticos (adaptado de Pintori, Loi e Mereu, 2017).	16
Figura 8. Estrutura química de alguns canabinóides sintéticos pertencentes à segunda geração de canabinóides sintéticos (adaptado de Pintori, Loi e Mereu, 2017).	17
Figura 9. Estrutura química de alguns canabinóides sintéticos pertencentes à terceira geração de canabinóides sintéticos (adaptado de Pintori, Loi e Mereu, 2017).	18
Figura 10. Metabolismo do canabinóide sintético JWH-018 (adaptado de Tai e Fantegrossi, 2016).	21

Figura 11. Metabolismo do canabinóide sintético JWH-200, sendo M3 um dos possíveis metabolitos formados (adaptado de De Brabanter et al., 2013). 22

Figura 12. Metabolismo dos canabinóides sintéticos PB-22 e 5F-PB-22, correspondendo o PI-COOH ao 1-pentil-1H-indol-3-ácido carboxílico (adaptado de Castaneto et al., 2015). 23

Índice de tabelas

Tabela 1. Agonistas e antagonistas dos recetores canabinóides (Adaptado de Niaz et al., 2017).....	9
Tabela 2. Classes de canabinóides sintéticos e exemplos das mesmas (adaptado de Davidson et al, 2017).....	18
Tabela 3. Casos de canabinóides sintéticos encontrados em diferentes amostras de sangue e respetivas concentrações (Chase et al., 2016; Jaenicke et al., 2018 e Labay et al., 2016).	32

Lista de abreviaturas

Δ^9 -THC – delta-9-tetrahidrocanabinol

2-GA – 2-araquidonilglicerol

AMP – adenosina monofosfato

CBD – Canabidiol

CBR – Recetores dos canabinóides (do inglês *Cannabinoids receptors*)

CG – Cromatografia gasosa

CL – Cromatografia líquida

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*)

ESI – Ionização por electrospray (do inglês *Electrospray ionization*)

GABA – ácido gama-aminobutírico

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa (do inglês *Gas-chromatography-mass spectrometry*)

HEIA – Imunoensaio enzimático homogéneo (do inglês *Homogeneous enzyme immunoassay*)

LC-HRMS – Cromatografia líquida acoplada a espetrometria de massa de alta resolução (do inglês *Liquid-chromatography-high resolution mass spectrometry*)

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada a espetrometria de massa (do inglês *Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry*)

LLE – Extração líquido-líquido (do inglês *Liquid-liquid extraction*)

NT - Neurotransmissor

NADA - Dopamina N-araquidonoil

SALLE – Extração líquido-líquido assistida por salting-out (do inglês *Salting-out liquid-liquid extraction*)

SPE – Extração em fase sólida (do inglês *Solid-phase extraction*)

SNC – Sistema nervoso central

I. INTRODUÇÃO

O mundo das drogas recreativas alterou-se nas últimas décadas com o aparecimento contínuo e consequente consumo de uma série de novas substâncias psicoativas (NSP), com grande popularidade entre os adolescentes e jovens adultos. As NSP são substâncias de abuso que podem ser apresentadas na sua forma pura ou na forma de um preparado e que não são controladas pela Convenção sobre as Substâncias Psicotrópicas, pelo que constituem um risco para a saúde pública (Janikova et al., 2016). São consideradas uma classe emergente de compostos que são vendidos como substitutos legais a drogas de abuso clássicas como a canábis, cocaína e anfetaminas (Meyer, 2018). Estas NSP foram desenhadas e sintetizadas com o intuito de mimetizar o efeito de uma droga ilegal, mas apresentam uma estrutura química diferente ou ligeiramente modificada de modo a poderem escapar às restrições legais daquelas substâncias. O consumo das NPS é estimulado pelo preço relativamente baixo que é praticado para estas drogas, tendo em linha de conta os efeitos mais potentes que os da canábis, bem como a facilidade com que estas drogas são compradas (OEDT, 2017).

Entre estas novas substâncias psicoativas destacam-se os canabinóides sintéticos (OEDT, 2017), substâncias estruturalmente análogas ao delta-9-tetrahidrocanabinol (THC), o principal canabinóide responsável pelos efeitos psicoativos da planta *Cannabis sativa* (OEDT, 2017).

Canabinóides é um termo genérico para descrever um grupo heterogéneo de substâncias, naturais ou artificiais, que se ligam a recetores canabinóides do tipo CB₁ ou CB₂. Englobam os canabinóides encontrados na planta *Cannabis sativa* (fitocanabinóides, como o Δ^9 -THC e o canabidiol (CBD)), os endocanabinóides, que são encontrados nos sistemas nervoso e imunológico dos seres humanos, e, por fim, os canabinóides sintéticos (Reggio, 2002).

Os compostos canabinóides identificados na planta (fitocanabinóides) ligam-se aos recetores canabinóides CB₁ e CB₂ (Brown, 2007). O recetor CB₁ expressa-se no sistema

nervoso central e também no periférico. Por sua vez, o recetor CB₂ está localizado nas células imunitárias, tendo um papel importante na regulação do processo inflamatório (Hudson e Ramsey, 2011).

Os efeitos psicotrópicos do Δ^9 -THC são mediados pelos recetores canabinóides CB₁ acoplados à proteína G, resultando na inibição da transmissão sináptica mediada pelo recetor CB₁ (Hermanns-Clausen et al., 2012).

Os recetores canabinóides CB₁ e CB₂ podem ser igualmente ativados por canabinóides endógenos (endocanabinóides), como é o caso da anandamida e do 2- araquidonilglicerol (2-GA) (Brown, 2007; Hermanns-Clausen et al, 2012).

Os canabinóides sintéticos foram desenvolvidos no sentido de se obterem agonistas mais potentes e seletivos, comparativamente aos fitocanabinóides. Foram então sintetizados um grande número de canabinóides, análogos ao Δ^9 -THC, com vista a diminuir os efeitos psicotrópicos e isolar a ação terapêutica (OEDT, 2017). Os canabinóides sintéticos produzem efeitos farmacológicos com potencial terapêutico no tratamento da dor, enxaquecas, náuseas, vômitos e perda de apetite (Reggio, 2005). Devido ao potencial terapêutico do Δ^9 -THC, o dronabinol (Marinol) foi introduzido no mercado em 1980 (Pain, 2015) com finalidade antiemética, em doentes que realizam quimioterapia (eMedicineHealth, 2018). O dronabinol foi inicialmente utilizado também no tratamento da perda de apetite em seropositivos.

O cenário que envolvia os canabinóides sintéticos foi alterado quando começaram a surgir como “drogas legais” em determinados países a partir de meados da década de 2000. Estas novas substâncias psicoativas estão a provocar uma variedade de danos graves, constituindo uma preocupação crescente na Europa. No final de 2016, já haviam sido monitorizadas cerca de 620 NPS, das quais cerca de um terço correspondia a canabinóides sintéticos (OEDT, 2017). De acordo com o Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (OEDT), os canabinóides sintéticos constituem o maior grupo de

NSP, sendo que, juntamente com as catinonas sintéticas, constituíram, em 2015, mais de 60% de número total de novas substâncias (Relatório Europeu sobre drogas, 2017).

Os canabinóides sintéticos são vulgarmente vendidos como misturas herbáceas para fumar designadas de “K2” ou “Spice”, entre muitas outras. Embora atualmente muitas destas NPS já façam parte da lista de substâncias controladas pela legislação em muitos países, continuam a ser vendidas ilegalmente nas ruas e também em *websites* na Internet (OEDT, 2017).

Apesar de representarem um grupo relativamente recente, foram já descritos vários casos de intoxicações e mortes associadas ao consumo destas drogas. Deste modo, a determinação de canabinóides sintéticos e dos seus metabolitos em amostras biológicas assume grande interesse em Toxicologia Clínica e Forense. No âmbito da Toxicologia Forense, os canabinóides sintéticos encontram-se envolvidos em questões do âmbito judicial, podendo, por exemplo, ser a causa de morte do indivíduo em situações de sobredosagem ou afetando a capacidade do consumidor para a condução rodoviária. Portanto, esta dissertação teve por objetivo realizar uma revisão da literatura científica sobre a importância dos canabinóides sintéticos em contexto forense. Para um bom desempenho em Toxicologia Forense torna-se fundamental conhecer as propriedades farmacocinéticas destas novas substâncias, os sinais e sintomas de intoxicação, os fatores que afetam a concentração *post mortem*, bem como assegurar a integridade das amostras recolhidas *post mortem* e a estabilidade no armazenamento das amostras destinadas a análise toxicológica (Huestis et al., 2017).

II. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta revisão bibliográfica, foi realizada uma pesquisa em bases de dados como a PubMed e a Toxnet, utilizando as seguintes palavras-chave: “synthetic cannabinoids”, “forensics”, “pharmacokinetics”, “pharmacodynamics”, “post mortem cases”, “toxicity”, “analytical methodology” e “forensic toxicology”. Os critérios de inclusão foram o respeito pelas palavras-chave, artigos científicos escritos em Português, Inglês e Francês

e o acesso aos artigos na sua versão completa. Foi ainda recolhida informação em livros e *websites* governamentais, através do motor de busca “Google”. Esta pesquisa decorreu de 1 de outubro de 2017 até 9 de junho de 2018.

III. CANNABIS SATIVA E CANABINÓIDES

A planta *Cannabis sativa* já é conhecida há milhares de anos. É uma planta nativa da Ásia, mas está espalhada por todo o mundo (Zaami et al, 2018).

Esta planta contém mais de 60 canabinóides diferentes, sendo o seu principal constituinte psicoativo o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC). Desde 1839, a planta era utilizada no tratamento de doenças como a epilepsia e o reumatismo, devido às suas propriedades anticonvulsivantes, analgésicas e antieméticas. Nos séculos XIX e XX a canábis continuou a ser utilizada para fins terapêuticos, mas devido à sua instabilidade farmacológica, o seu uso foi decrescendo (Zaami et al, 2018). O THC foi considerado pela *Drug Enforcement Administration* (DEA), nos EUA, como uma droga de classe I, ou seja, substância sem qualquer utilidade terapêutica e com alto potencial aditivo. Por outro lado, o seu derivado sintético, dronabinol, é considerado classe III (reconhecido uso terapêutico e baixo potencial para causar dependência) (Pamplona, 2014), sendo usado há cerca de dez anos na prática clínica no tratamento da perda de peso relacionada com a anorexia em doentes com SIDA e em doentes oncológicos (Reggio, 2005).

Os compostos com origem na *Cannabis sativa* foram denominados de canabinóides, tendo efeitos associados aos recetores canabinóides CB₁ e CB₂ (Le Boisselier, Alexandre e Lelong-Boulouard, 2016). A principal substância psicoativa da canábis ativa estes dois recetores acoplados à proteína G (Camilleri, 2018). No entanto, como hoje em dia existem outras substâncias não provenientes da planta que atuam nos mesmos recetores, passou-se a denominar de fitocannabinóides aos que têm origem na planta e de endocannabinóides àqueles que são de origem endógena (Le Boisselier, Alexandre e Lelong-Boulouard, 2016). Existem, então, canabinóides naturais, endógenos e sintéticos, sendo que estes últimos fazem parte do tema deste trabalho e serão abordados no capítulo seguinte.

Em suma, existem atualmente três grupos principais de canabinóides:

- ✓ Os fitocanabinóides, como o Δ^9 -THC, psicoativo, e o CBD, não psicoativo, presentes na planta *Cannabis sativa*;
- ✓ Os endocanabinóides, como a anandamida e o 2-AG, produzidos por mamíferos;
- ✓ Os canabinóides sintéticos, criados para mimetizar os efeitos do THC para uso recreativo.

3.1. Fitocanabinóides

A planta *Cannabis sativa* produz mais de 100 compostos, denominados de fitocanabinóides (Niaz et al, 2017). Alguns dos fitocanabinóides produzidos por esta planta são o Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabinol, canabidiol, canabigerol, canabicromeno, Δ^9 -tetrahydrocannabivarin e canabidivarin (Davidson et al., 2017), sendo os principais constituintes ativos o cannabinol, canabidiol e THC, representados na figura 1 (Ramlugon, Levendal e Frost, 2018). Destes, o cannabinol é um psicoativo mais fraco que o THC. O cannabinol representa um papel importante na prevenção ou redução da psicoatividade relacionada com o THC (Ramlugon, Levendal e Frost, 2018).

O Δ^9 -THC tem uma afinidade moderada para os recetores CB₁ e CB₂ e atua como um agonista parcial, enquanto o canabidiol tem menos afinidade para os mesmos recetores (Le Boisselier, Alexandre e Lelong-Boulouard, 2016). Tanto o THC como o canabidiol exercem os seus efeitos terapêuticos através dos recetores canabinóides (CBR do inglês *Cannabinoids receptors*). Os recetores 55 acoplado à proteína G (GRP55), canais de iões ligados ao ligando 5-hidroxitriptamina-3A, recetor ionotrópico de potencial transitório A1 (TRPA1) e o recetor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV-1) também podem estar envolvidos nos efeitos terapêuticos. No entanto, ainda não é realmente conhecida a ação destes últimos recetores. O CBD mostrou ser responsável pelo bloqueio dos

recetores CB, pela ativação de vários canais catiónicos TRP e pela ativação do recetor 5-HT_{1A} (Bow e Rimoldi, 2016).

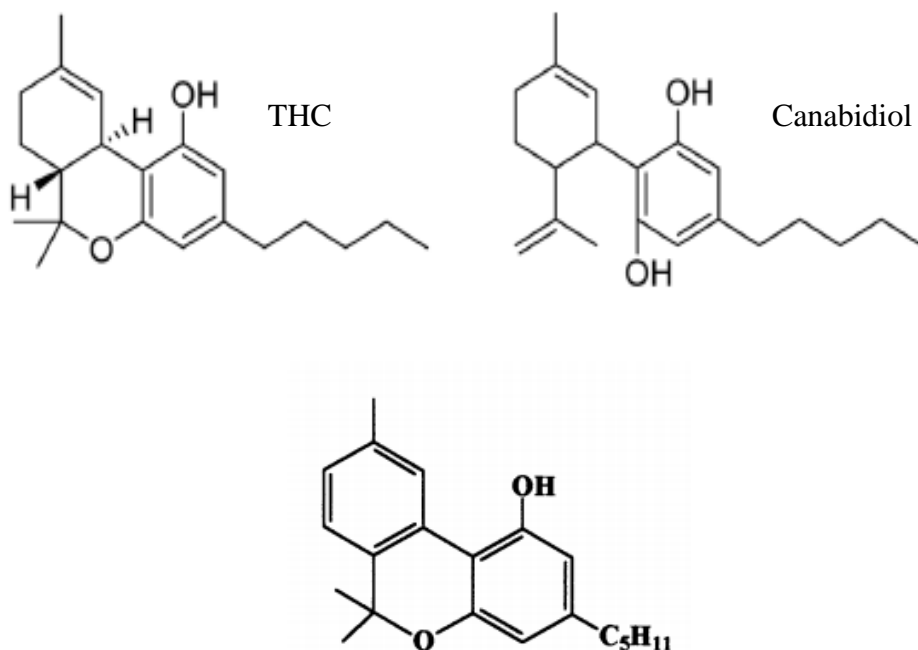


Figura 1. Estruturas químicas do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), do canabidiol e do canabinol (adaptado de Bow e Rimoldi, 2016; Mechoulam e Hanus, 2000).

3.2. O sistema endocanabinóide

O sistema endocanabinóide está envolvido em vários processos biológicos, como por exemplo o balanço de energia, motilidade intestinal e respostas imunitárias (Basu et al, 2014), bem como a memória, a sensação de dor, o apetite, a homeostasia, entre outros (Le Boisselier et al., 2016). Foram identificados dois tipos de recetores de canabinóides: o CB₁, que foi clonado em 1990, e o CB₂, clonado em 1993, ambos da família dos recetores acoplados à proteína G (Pertwee, 2006). O CB₁ é encontrado essencialmente nos terminais dos neurónios centrais mas também pode ser encontrado em alguns tecidos periféricos, como por exemplo tecidos gastrointestinas. Está presente também em

algumas células não neuronais como as células imunitárias. Já os recetores CB₂ estão localizados principalmente no sistema imunitário, tendo como principal função modular a libertação das citocinas. No cérebro, são expressos na microglia, vasos sanguíneos e alguns neurónios (Pertwee, 2006).

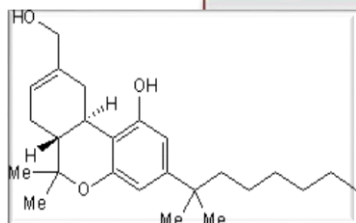
O sistema endocanabinóide é também constituído por enzimas responsáveis pela degradação dos endocanabinóides, como, por exemplo, a lípase monoglicérida e a hidrolase de amidas de ácidos gordos (Basu et al, 2014), e transportadores que regulam os níveis de endocanabinóides (Le Boisselier et al., 2016).

Os primeiros recetores marcados pelo THC foram os recetores acoplados à proteína G (CB₁ e CB₂). A ativação destes recetores bloqueia a ativação da adenilciclase, impedindo a sinalização através do AMP cíclico.

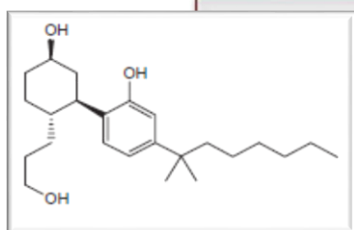
O recetor CB₁ foi o primeiro a estar envolvido na sinalização neuronal retrógrada: está localizado na pré-sinapse (Figura 3). A sua ativação pode fazer com que haja uma redução na libertação de neurotransmissores (NT). Tipicamente, a sinalização através de sinapses pelos NT resulta na síntese de endocanabinóides (canabinóides endógenos), com a sua consequente libertação na fenda sináptica, levando a uma sinalização retrograda para terminar a libertação do neurotransmissor (Starowicz e Finn, 2017).

Os compostos que ativam os recetores CB₁ e CB₂ com potência semelhante e que são usados como agonistas destes recetores fazem parte de quatro grupos: canabinóides clássicos, canabinóides não clássicos, aminoalquilindóis e eicosanóides, como demonstrado na figura 2 e tabela 1 (Pertwee, 2006).

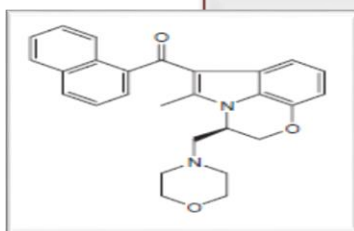
Os recetores canabinóides atuam sobre os recetores CB₁ e CB₂, sendo agonistas totais destes recetores. O JWH-018, um canabinóide sintético, apresenta quatro vezes mais afinidade para o recetor CB₁ do que o THC, e dez vezes mais para o recetor CB₂, sendo os canabinóides sintéticos mais potentes que a marijuana (Minns, 2013).



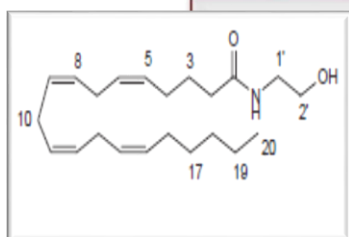
Clássicos: Os compostos que fazem parte deste grupo são derivados dos dibenzopiranos, naturais como o Δ^9 -THC, ou análogos sintéticos, como o Δ^8 -THC e 11-hidroxi- Δ^8 -THC-dimetilheptil (HU-210).



Não clássicos: Em estrutura, estes compostos são semelhantes aos canabinóides clássicos, consistindo em análogos bicíclicos e tricíclicos do Δ^9 -THC onde falta um anel pirano. O mais usual é o CP-55,940.



Aminoalquilindóis: O composto mais conhecido neste grupo é WIN 55,212-2.



Eicosanóides: Os compostos mais investigados neste grupo são os endocanabinóides anadamida e 2-AG.

Figura 2. Classificação de agonistas dos recetores canabinóides (adaptado de Pertwee, 2006).

Recetores	Agonistas	Antagonistas
CB ₁ e CB ₂	Δ9-THC HU-210 CP-55 CP-950 WIN-55 WIN-212,2	-
Seletivo para CB ₁	-	Rimonabant Surinabant Ibipinabant
Seletivo para CB ₂	HU-308 JWH-133 JWH-015	SR-144528 AM-680

Tabela 1. Agonistas e antagonistas dos recetores canabinóides (adaptado de Niaz et al., 2017).

Os canabinóides sintéticos atuam nos recetores canabinóides CB₁ e CB₂ como agonistas, exibindo os seus efeitos terapêuticos no tratamento das náuseas provocadas pela quimioterapia e pela anorexia proveniente do vírus da SIDA, em desordens neurológicas, no glaucoma e até como analgésico (Goya e Jagerovic, 2000). O recetor CB₁ está predominantemente expresso na fenda pré-sináptica, modulando a libertação de NT como o GABA, dopamina, noradrenalina, glutamato e serotonina. A forma como os CS afetam a libertação destes neurotransmissores não se encontra totalmente esclarecida (Korenis et al., 2016). Os canabinóides sintéticos inibem o excesso de neurotransmissores na junção dos neurónios pré-sinápticos e pós-sinápticos (que mimetizam os efeitos dos endocanabinóides) (Niaz et al., 2017).

Os neurotransmissores dos neurónios pré-sinápticos ativam os recetores pós-sinápticos, levando à libertação dos canabinóides endógenos. O ligando CB₁ liga-se ao seu recetor CB₁, o que estimula a proteína G, levando à inibição da libertação de NT. Os canabinóides sintéticos atuam ativando diretamente o recetor CB₁, mimetizando desta forma os efeitos dos canabinóides endógenos, como ilustrado na figura 3 (Niaz et al., 2017).

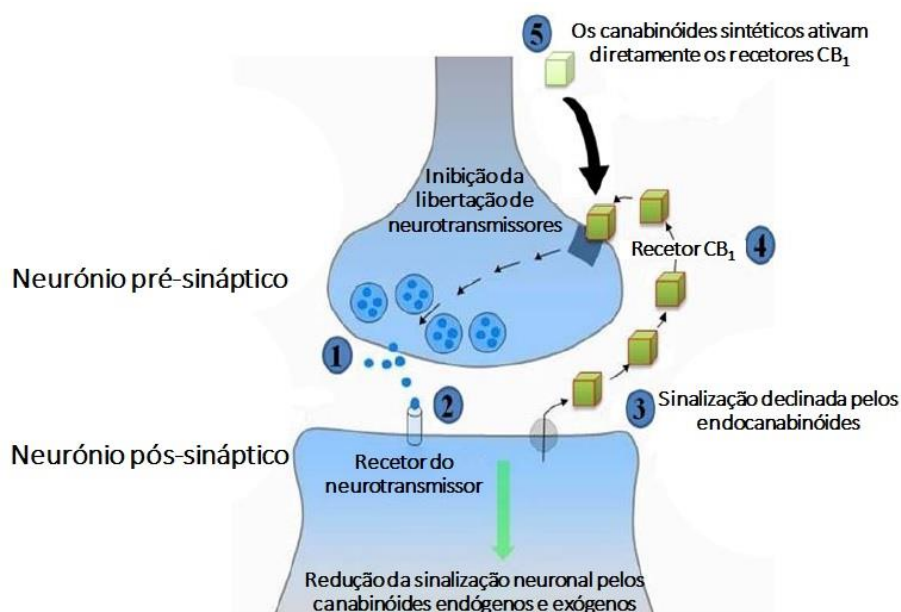


Figura 3. Mecanismo de ação dos canabinóides nos terminais pré e pós-sinápticos. 1) Os neurotransmissores do neurónio pré-sináptico ativam o neurónio pós-sináptico; 2) o neurónio pós-sináptico ao ser estimulado liberta endocanabinóides; 3) o ligando CB₁ endógeno dissemina-se e liga-se ao recetor CB₁ na fenda pré-sináptica; 4) o recetor CB₁ estimula a proteína G, levando à inibição da libertação dos neurotransmissores; 5) os canabinóides sintéticos ativam diretamente os recetores CB₁, mimetizando os efeitos dos endocanabinóides (adaptado de Niaz et al., 2017).

Portanto, para além de atuarem como um agonista total dos recetores CB₁, os CS atuam também no recetor CB₂, e nos neurotransmissores como a dopamina, glutamato, GABA, serotonina, e nos recetores alfa e beta adrenérgicos (Korenis et al., 2016).

Os canabinóides sintéticos podem ser divididos em canabimiméticos, sendo aqueles que têm atividade farmacológica análoga à da canábis (agonistas para os recetores CB₁ e CB₂), em antagonistas que se ligam aos recetores canabinóides sem produzir efeitos como os da canábis, mas bloqueando os recetores para outros compostos, e finalmente substâncias que não se ligam significativamente a esses recetores, não tendo efeitos farmacológicos mediados por nenhum desses recetores canabinóides, sendo que estas substâncias ainda não se encontram bem estudadas (UNODC, 2011).

A importância fulcral do recetor CB₁ é refletida no desenvolvimento de antagonistas com alta afinidade para este recetor, usados na terapêutica da diabetes e obesidade, por exemplo, como é o caso do Rimonabant, antagonista seletivo para o recetor CB₁ (Brown, 2007). No entanto, este canabinóide sintético foi retirado do mercado devido aos seus efeitos adversos (Niaz et al, 2017).

3.3. Canabinóides endógenos

Os endocanabinóides, como a anandamida e o 2-AG representados na figura 4, são substâncias naturais e endógenas encontradas em vários tecidos mamários e células como macrófagos, células do neuroblastoma, entre outras (Sugiura, 2008) e as suas atividades são mediadas pelos recetores CB₁ e CB₂ (Basu et al, 2014).

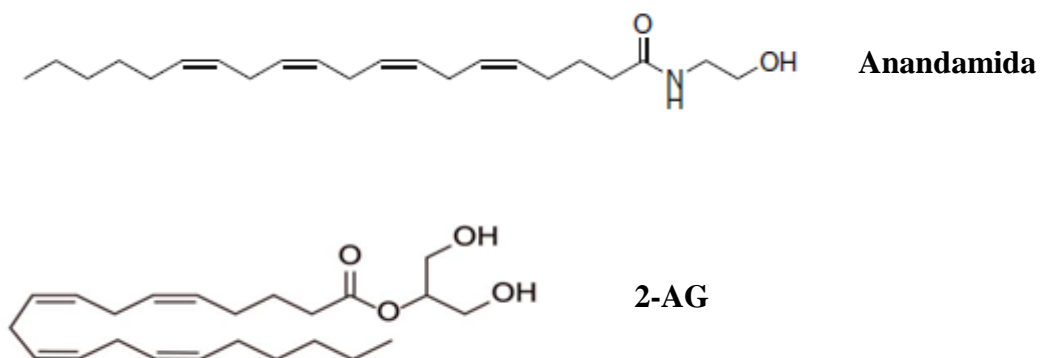


Figura 4. Estruturas químicas da anandamida e do 2-araquidonilglicerol (2-GA) (adaptado de Gao e Wang, 2018; Deng e van der Stelt, 2017)

O primeiro endocanabinóide identificado foi a anandamida, que apresenta uma afinidade média para os recetores CB₁. Esta molécula foi encontrada em todos os locais do organismo onde existem esses recetores, mas também em alguns locais onde existem os recetores CB₂, mostrando que a anandamida também tem atividade a nível periférico. Foi também descoberto outro canabinóide endógeno, o 2-AG, que tem um papel importante a nível cerebral (Teixeira, 2015). São ainda conhecidos outros compostos

endocanabinóides, como o 2-araquidonilgliceroléter, a etanolamina O-araquidonoil e a dopamina N-araquidonoil (NADA).

Estes têm estrutura diferente dos fitocanabinóides, mas as estruturas 3D demonstram que têm habilidade para interagir do mesmo modo com os recetores dos canabinóides (Le Boisselier, Alexandre e Lelong-Boulouard, 2016).

IV. CANABINÓIDES SINTÉTICOS

4.1. História

Desde 1960 que os canabinóides sintéticos começaram a ser sintetizados com o objetivo de investigar os seus potenciais efeitos terapêuticos (Mills, Yepes e Nugent, 2015). Os dados apontam para que os canabinóides sintéticos já sejam vendidos desde 2000 através da Internet. No entanto, apenas em 2008 foi detetado um destes compostos canabinóides em misturas para fumar (OEDT, 2017). Desde 2008 até 2015, foram identificados cerca de 180 canabinóides sintéticos (Fattore, 2018), sendo hoje conhecidos cerca de 200 canabinóides sintéticos com diferentes estruturas em todo o mundo. Em 2016, o canabinóide sintético MDMB-CHMICA foi o primeiro CS a ser avaliado pelo OEDT, tendo até então sido verificadas cerca de 30 mortes por consumo do mesmo (OEDT, 2017).

Os canabinóides sintéticos são vendidos como misturas de ervas para fumar, sob uma variedade de designações como “K₂”, “Spice”, “Fake Marijuana”, entre outras, contendo análogos químicos do THC (Figura 5) (Pourmand et al., 2017). Como possuem cerca de 3 gramas de plantas, como a *Leonotis leonuros* e *Pedicularis densiflora*, isso leva os consumidores a acreditar que são drogas naturais (Mills, Yepes e Nugent, 2015). Os “Spice” são então misturas herbáceas para fumar, pulverizadas com canabinóides sintéticos, de forma a mimetizar o ingrediente psicoativo da canábis (Pintori, Loi e Mereu, 2017).



Figura 5. Pacotes contendo canabinóides sintéticos comercializados sob diversas designações (Newsweek, 2017).

Estas drogas podem ser facilmente compradas em *websites* na Internet ou em lojas especializadas designadas de *smartshops*. O primeiro canabinóide sintético a ser identificado foi o JWH-018, que possui este nome devido à descoberta da molécula WIN 55,212-2, um aminoalquilindol, que se liga aos recetores CB₁ e CB₂ com maior afinidade do que o THC (Pintori, Loi e Mereu, 2017). Esta molécula revolucionária levou John W. Huffman, que trabalhava na Universidade de Clemson, a concluir que uma simples cadeia alquilo poderia substituir o grupo aminoalquilo. Esta descoberta levou ao surgimento de vários análogos com o nome de JWH, caracterizados pela sua afinidade aos recetores canabinóides (Brock, 2012).

Alguns dos canabinóides sintéticos detetados no “Spice” pertencem, então, à série “JWH” (Davidson et al, 2017). Existem outros CS cujo nome começa por AM, em homenagem ao cientista que os sintetizou, Alexandros Makriyannis, ou por HU, aqueles que são provenientes da Universidade Hebraica, ou ainda por CP, por terem sido sintetizados por Carl Pfizer (Karila et al, 2017).

4.2. Formas de consumo

Os canabinóides sintéticos são consumidos habitualmente por via inalatória, ou seja, fumando charros ou fumando as misturas herbáceas através de bongos de água (UNODC, 2011).

Ao contrário do THC, os canabinóides sintéticos estão presentes nas suas formas psicoativas estáveis que são vaporizadas sem se decomporem (UNODC, 2011).

Também existem relatos de consumo de canabinóides sintéticos por via oral, através de pastilhas. Já a preparação de infusões não é muito comum devido à baixa solubilidade destes compostos (lipofílicos) em água (UNODC, 2011).

4.3. Prevalência

Na Europa em geral, o consumo de canabinóides sintéticos é relativamente baixo. Já nos Estados Unidos da América, a prevalência é maior (OEDT, 2017). Ainda assim, em 2014, nos EUA, os dados apontam para uma diminuição do consumo de canabinóides sintéticos. Nesse ano, o consumo entre estudantes de 17/18 anos foi de 5,8%, comparativamente aos valores de 2013, que eram de 7,9%, e de 2012, de 11,3%. Na Europa, nomeadamente em estudos realizados no Reino Unido, os valores encontrados foram de 0,2% em 2010/2011 e 0,1% em 2011/2012. Em Espanha e França, os valores de consumo dos canabinóides sintéticos situam-se entre 1% e 1,7%, o que revela uma grande diferença relativamente aos EUA (OEDT, 2017).

Os canabinóides sintéticos são normalmente consumidos por homens mais jovens, com idades inferiores a 35 anos. Além disso, os consumidores destas drogas são sobretudo jovens que frequentam a vida noturna e/ou utilizadores da Internet, onde estes canabinóides podem ser facilmente adquiridos (OEDT, 2017).

4.4. Estrutura química

Os canabinóides sintéticos têm estruturas químicas diferentes entre si e relativamente ao THC (OEDT, 2017).

A estrutura da maioria dos canabinóides sintéticos pode ser dividida em: cauda, núcleo, ligação e grupo ligado ou anel (OEDT, 2017), como apresentado na Figura 6. O núcleo principal encontra-se normalmente ligado ao grupo ligado por uma ponte (Boisselier et al., 2016).

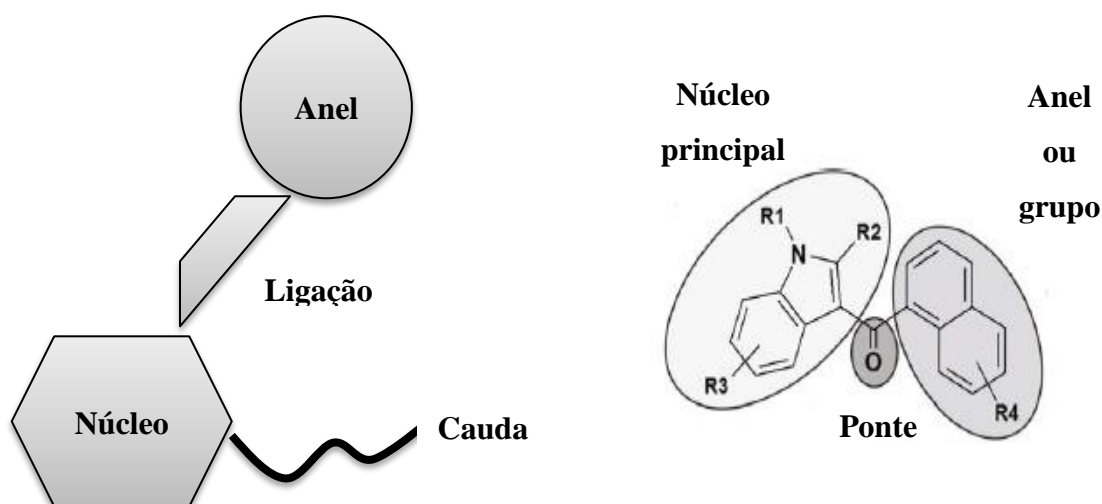


Figura 6. Estrutura geral dos canabinóides sintéticos (OEDT, 2017), sendo R1 a cauda ligada ao núcleo (Le Boisselier et al., 2016).

No nome químico dado aos canabinóides sintéticos, os substituintes da cauda aparecem à frente do nome, de seguida os substituintes do grupo ligado, antes do grupo ligado. No fim da denominação são colocados os substituintes do núcleo (OEDT, 2017).

Alguns canabinóides sintéticos recebem o nome consoante a sua estrutura química. Por exemplo, o composto dado pelo nome de APICA, tem a seguinte estrutura: N-(1-Adamantil)-1-Pentil-1H-Indazole-3-CarboxAmida). No fundo, isto permite identificar a

estrutura química do canabinóide sem que seja necessário expor o nome químico completo (OEDT, 2017).

Torna-se mais fácil utilizar este tipo de nomenclatura, ficando os canabinóides sintéticos com uma abreviatura única. Assim sendo, sempre que aparecer, por exemplo, o “A”, sabe-se que se refere a uma substância amina no grupo ligado, e “CA” a uma substância carboxamida (OEDT, 2017).

Foram caracterizadas três gerações de canabinóides sintéticos. A **primeira geração de canabinóides sintéticos** inclui os derivados JWH-018, CP-47,497 e HU-210 (Figura 7) (Pintori, Loi e Mereu, 2017).

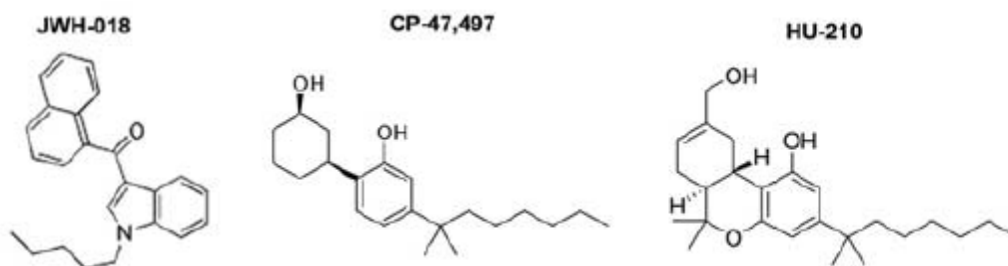


Figura 7. Estrutura química de alguns canabinóides sintéticos pertencentes à primeira geração de canabinóides sintéticos (adaptado de Pintori, Loi e Mereu, 2017).

A **segunda geração de canabinóides sintéticos** inclui os derivados alquílicos, N-metilpiperidinas e benzoilindóis (Figura 8) (Pintori, Loi e Mereu, 2017).

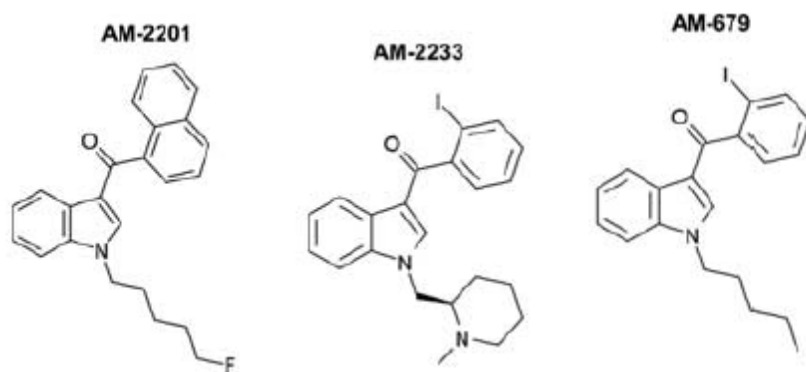


Figura 8. Estrutura química de alguns canabinóides sintéticos pertencentes à segunda geração de canabinóides sintéticos (adaptado de Pintori, Loi e Mereu, 2017).

A **terceira geração de canabinóides sintéticos** (Figura 9) inclui os derivados onde o anel indólico é substituído por um grupo indazol ou benzimidazol, ou moléculas onde o grupo carbonilo é substituído por um grupo carboxílico ou carboxiamida, ou quinolonas com uma estrutura secundária cíclica e grupos nitrogénicos (Pintori, Loi e Mereu, 2017).

No entanto, estes canabinóides sintéticos podem ser conhecidos por vários nomes comerciais. O composto JWH-018 foi denominado de “K2”, “Spike”, “Space” e “K3”, e o CP-47,497 de “Earthquake”, “Ocean Blue” e “Woodstock”. Por sua vez, o composto AM-2201 ficou conhecido como “Bonzai Summer” e o 5F-PB-22 como “Atomic Bomb”, “Black Mamba”, “Haze”, “Juicy leaf” ou “Spike 99” (Davidson et al, 2017).

Os canabinóides sintéticos são atualmente divididos em classes como demonstrado na tabela 2 (Davidson et al, 2017). No entanto, como existem muitos substituintes, vão surgindo continuamente novas classes, estando, portanto, constantemente em mudança o número de classes existentes de canabinóides sintéticos (Davidson et al, 2017).

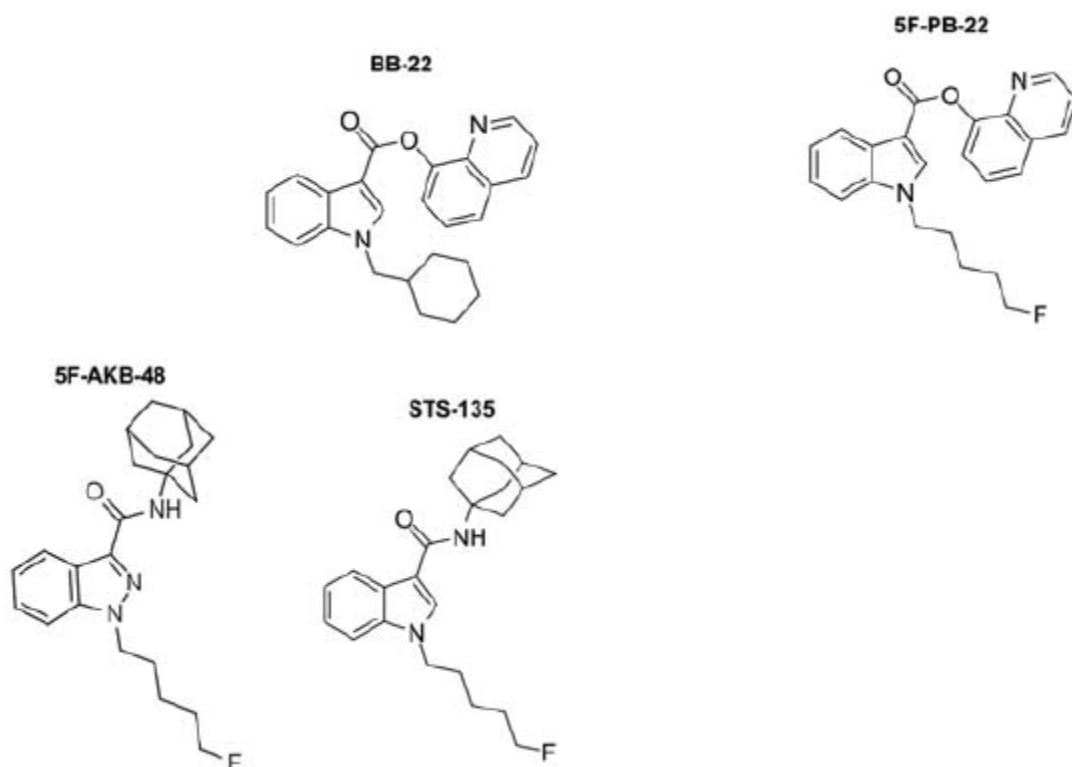


Figura 9. Estrutura química de alguns canabinóides sintéticos pertencentes à terceira geração de canabinóides sintéticos (adaptado de Pintori, Loi e Mereu, 2017).

Classes de canabinóides sintéticos	Exemplos
Naftolindóis, Naftilmetilindóis, Naftolpirróis e Naftilmetilindenos	JWH-007; JWH-018; JWH-073; JWH-200; JWH-398; AM-1221; AM-2201; AM-694; WIN-55,212-2
Fenilacetilindóis	J2H-250; RCS 8
Ciclohexilfenóis	CP-47-947; CP-55-940
Tetrametilciclopropilindóis	UR-144; XLR-11
Adamantolindóis	5F-AKB-48; STS-135
Indazol carboxamidas	AB-PINACA; AB-FUBINACA
Quinolinil éster	PB-22

Tabela 2. Classes de canabinóides sintéticos e exemplos das mesmas (adaptado de Davidson et al, 2017).

4.5. Toxicocinética

O conhecimento farmacológico dos canabinóides sintéticos é ainda limitado, mas os dados toxicológicos obtidos até ao momento servem como aviso de que desfechos muito graves podem ocorrer devido ao consumo de canabinóides sintéticos e que possivelmente existe uma concentração sérica letal para os canabinóides sintéticos (Freund e Banning, 2017).

4.5.1. Absorção

Quando a droga é fumada, o início da ação ocorre em minutos, como acontece na canábis. Isto deve-se ao facto da droga ser absorvida rapidamente nos pulmões e distribuída para outros órgãos, como o cérebro, em minutos. Há um certo atraso na absorção quando a droga é consumida por via oral devido à ingestão de alimentos (UNODC, 2011).

A biodisponibilidade destas drogas depende do modo de administração. Na administração oral dos CS vai haver sempre perda da droga devido ao efeito de primeira passagem hepática (UNODC, 2011).

4.5.2. Distribuição

Tal como os fitocannabinóides, os CS são altamente lipofílicos e atravessam facilmente a barreira hematoencefálica (Fattore, 2018). Deste modo, é normal que os CS tenham alto volume de distribuição (Sobolevsky, Prasolov e Rodchenkov, 2010).

Sendo altamente lipofílicos, quando consumidos de forma crónica pode ocorrer acumulação das substâncias e/ou dos seus metabolitos no tecido adiposo e noutras partes do corpo que contenham algum teor de gordura (UNODC, 2011).

4.5.3. Metabolismo

Existem poucos estudos realizados até então acerca da biotransformação dos canabinóides sintéticos (Castaneto et al., 2015). No entanto, já foram realizados estudos *in vitro* e *in vivo* para a caracterização do perfil metabólico de algumas destas drogas (De Brabanter et al., 2013). A sequência de formação dos metabolitos dos CS é normalmente da seguinte forma: Os compostos sofrem oxidação mediada por enzimas do sistema citocromo P450 e posterior conjugação com o ácido glucurónico pelas glucuronosiltransferases (Fantegrossi et al., 2014).

O fígado é considerado o órgão mais importante no metabolismo dos canabinóides sintéticos, mas o intestino, o pulmão, o cérebro e o rim também poderão estar envolvidos na biotransformação destas drogas. Por um lado, o metabolismo dos CS pode levar à destoxificação e excreção de certos compostos. No entanto, noutros casos, pode ter um efeito contrário, levando à bioativação e consequentemente à ocorrência de efeitos adversos tóxicos (Diao e Huestis, 2016).

No caso do JWH-018, sabe-se que este composto sofre uma oxidação através das enzimas do citocromo P450 formando o metabolito ativo JWH-018 4-hidroxi-indol, como apresentado na figura 10. A CYP2C9 e a CYP1A2 foram consideradas as primeiras isoformas envolvidas na oxidação do JWH-018 (Fantegrossi et al., 2014).

Esse metabolito sofre posteriormente conjugação mediada pelas glucuronosiltransferases, formando o respetivo conjugado glucuronídeo (Tai e Fantegrossi, 2016).

Os metabolitos de fase I do JWH-018 são essencialmente formados por oxidação do anel indol ou da cadeia N-alquílica de modo a formar compostos mono-hidroxilados. Esses metabolitos são excretados via urinária na forma de conjugados glucuronídeos de fase II (Tai e Fantegrossi, 2016).

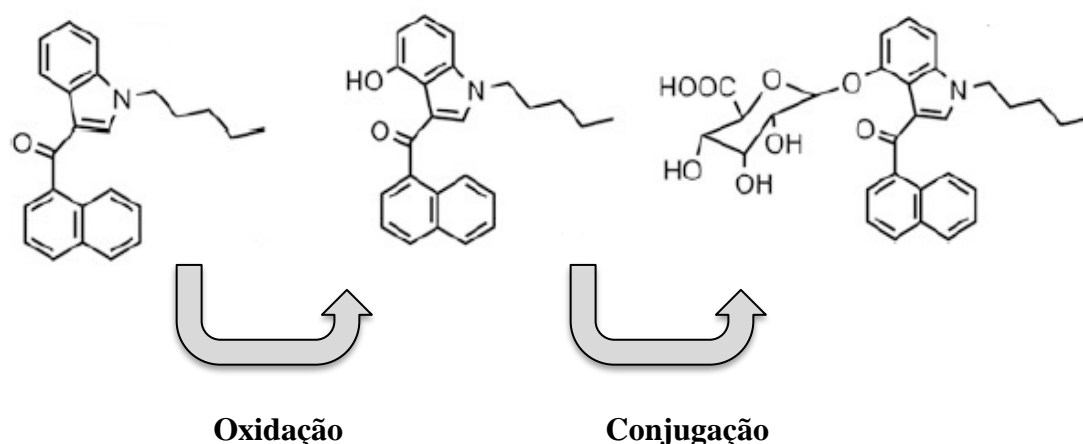


Figura 10. Metabolismo do canabinóide sintético JWH-018 (adaptado de Tai e Fantegrossi, 2016).

A isoenzima CYP2C9 é expressa no intestino, pelo que é provável que esta esteja envolvida no metabolismo de CS que sejam administrados oralmente. Já no caso da isoenzima CYP1A2, que se encontra no pulmão, pode ser importante no metabolismo de CS quando estes forem fumados (Fantegrossi et al., 2014).

O número de metabolitos detetados até hoje para este CS é indeterminado, sendo que o composto-pai pode sofrer várias reações, sendo estas, por exemplo, hidroxilação, desidratação, carboxilação, N-desalquilação, hidroxilação ou desidratação da cadeia lateral alquilo e mono-hidroxilação (Znaleziona et al., 2015).

Um outro canabinóide sintético do qual é conhecido o metabolismo é o JWH-200. Os metabolitos existentes deste CS podem ser formados, entre outros mecanismos, por hidroxilação e desidratação do composto-pai, como demonstrado na figura 11 (De Brabanter et al., 2013).

Relativamente ao metabolismo de outros canabinóides da classe JWH, como o JWH-250, formaram-se metabolitos através de reações de: mono-hidroxilação e di-hidroxilação de resíduos aromáticos e alifáticos do composto pai; tri-hidroxilação e desidratação da cadeia N-alquílica; N-desalquilação e mono-hidroxilação (Grigoryev et al., 2011).

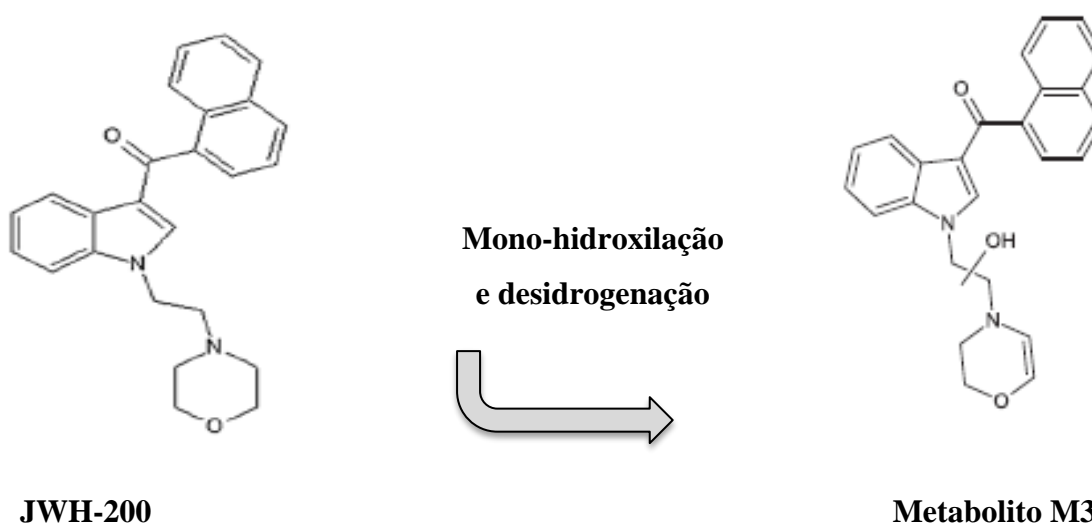


Figura 11. Metabolismo do canabinóide sintético JWH-200, sendo M3 um dos possíveis metabolitos formados (adaptado de De Brabanter et al., 2013).

Dentro da classe dos naftolindóis, a transformação mais comum de ocorrer é uma hidroxilação, ocorrendo também carboxilação e N-desalquilação. Em canabinóides sintéticos como o PB-22 e o 5F-PB-22 pode ocorrer hidrólise da ligação éster, e outros mecanismos que levam à formação de diferentes metabolitos, presentes na figura 12. O canabinóide sintético PB-22 pode sofrer uma hidroxilação seguida de uma carboxilação e de uma hidrólise do éster, formando o metabolito 1-pentil-1-OH-indol-3-ácido carboxílico-N-pentanóico. Do mesmo modo, o composto 5F-PB-22 ao sofrer uma hidrólise do éster, seguida de uma desalogenação oxidativa e carboxilação, pode converter-se no mesmo metabolito. Existem outras formas destes CS se transformarem noutros metabolitos iguais, sendo por isso difícil identificar qual a substância que aparece nas análises toxicológicas (Castaneto et al., 2015).

A maior parte dos metabolitos de fase II dos CS são glucuronídeos. Para além dos metabolitos que sofreram conjugação com o ácido glucurónico, outros metabolitos são formados por outras reações: o RCS-4 e o JWH-122, e conjugados de cisteína para os produtos da hidrólise dos CS anteriormente falados: PB-22 e 5F-PB-22 (Castaneto et al., 2015).

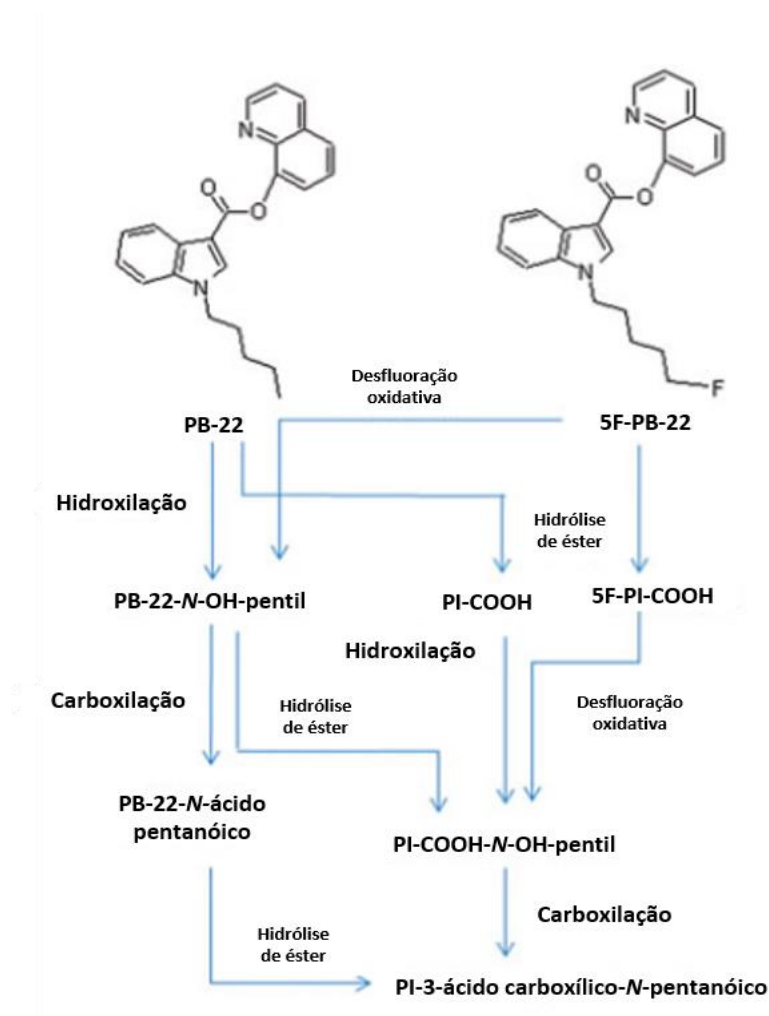


Figura 12. Metabolismo dos canabinóides sintéticos PB-22 e 5F-PB-22, correspondendo o PI-COOH ao 1-pentil-1H-indol-3-ácido carboxílico (adaptado de Castaneto et al., 2015).

O metabolismo dos canabinóides sintéticos torna-se bastante amplo na medida em que os mesmos metabolitos podem derivar de mais do que um composto-pai. Por exemplo, o 5'-OH-JWH-018 pode ser um metabolito do JWH-018 tendo ocorrido para a formação deste uma 5-hidroxilação, mas também pode ser um metabolito do AM-2201 por desalogenação oxidativa (Diao e Huestis, 2016).

4.5.4. Excreção

A excreção dos canabinóides sintéticos acontece normalmente por via urinária, na forma de metabolitos essencialmente glucuronídeos que têm mais grupos polares que o

composto-pai. Uma pequena quantidade pode ser excretada por via fecal (UNODC, 2011). Por exemplo, no caso do JWH-018, metabolitos carboxilados, mono-hidroxilados, di-hidroxilados e tri-hidroxilados são excretados na urina na forma de conjugados glucuronídeos (Crews, 2013).

As amostras de urina de consumidores de canabinóides sintéticos contêm altas concentrações de metabolitos glucuronídeos, sendo os metabolitos hidroxilados e carboxilados os mais prevalentes (Barnes et al., 2018) demonstrando a importância que a conjugação com o ácido glucurônico tem na excreção destas drogas na urina (Tai e Fantegrossi, 2016).

No caso de compostos como o CP-47,407-C8, para além de não ser detetado o composto-pai, as concentrações dos metabolitos a nível urinário são demasiado baixas, pelo que se torna difícil detetar este composto na urina (UNODC, 2011).

4.6. Efeitos tóxicos

Os canabinóides sintéticos são agonistas dos recetores canabinóides CB₁ mais potentes do que o Δ^9 -THC, justificando os efeitos mais tóxicos dos CS, e não contêm canabidiol, o constituinte ativo que para além de não provocar efeitos psicotrópicos, confere o efeito neuroprotetor, uma vez que é conhecido por ter propriedades ansiolíticas, revertendo a ansiedade em animais e humanos (Fattore e Fratta, 2011). Para além disso, o canabidiol reduz o metabolismo hepático do THC, reduzindo assim as alterações psicóticas (Lessa, Cavalcanti e Figueiredo, 2016).

O consumo deste tipo de drogas tem efeitos adversos a vários níveis, sendo os mais comuns: náuseas, vômitos, ansiedade, alucinações, agitação, taquicardia, hipertensão, insuficiência renal aguda, entre outros. Para além destes, existem ainda intoxicações por canabinóides sintéticos que apresentam uma série de outros sintomas, tais como:

- Efeitos cardiovasculares: Arritmias, cardiotoxicidade, enfarte do miocárdio, bradicardia (menos frequente) (Scocard et al, 2016)
- Efeitos pulmonares: Pneumopatias, lesões pulmonares não específicas, infiltrados pulmonares difusos (Scocard et al, 2016), hiperventilação ou apneia (Le Boisselier et al., 2016)
- Efeitos digestivos: Dores abdominais (Scocard et al, 2016), disfagia, lesões ulcerosas (Tournebize, Gibaja e Kahn, 2016)
- Efeitos hepatotóxicos: Aumento das enzimas séricas, falência hepática (Tournebize, Gibaja e Kahn, 2016)
- Efeitos oftalmológicos: Midríase ou miose, vermelhidão (dilatação dos vasos sanguíneos), fotossensibilidade (Le Boisselier et al., 2016)
- Efeitos nefrotóxicos: Necrose tubular aguda, nefrite intersticial aguda (efeitos raros) (Le Boisselier et al., 2016), aumento da creatinina, rabdomiólise (Scocard et al, 2016)
- Efeitos cerebrovasculares: Vasoespasmo cerebral, hipotensão sistêmica com diminuição da autorregulação cerebral, eventos cerebrovasculares agudos, acidente vascular cerebral (Le Boisselier et al., 2016)
- Efeitos psiquiátricos: Paranoia. Os canabinóides sintéticos têm um risco elevado de complicações psiquiátricas (Le Boisselier et al., 2016)
- Efeitos dermatológicos: Escurecimento da pálpebra, emagrecimento e envelhecimento do rosto, notório na zona das bochechas, envelhecimento precoce da pele, acne, calvície precoce (Scocard et al, 2016)

- Efeitos neurológicos: Tremores, sensação de vertigens, ataxia, fasciculações, hipertonia, hiperflexão, hiperrefletividade, hiperextensão, midríase, nistagmo, discurso lento, desordem de consciência, perturbações na memória, confusão, hemorragias, acidentes vasculares, crises de epilepsia, perturbações cognitivas não compatíveis com a condução (Scocard et al, 2016). Os canabinóides sintéticos induzem uma combinação de efeitos estimulantes e depressivos como euforia, riso fácil, percepção aumentada de estímulos externos alternando com sonolência e tonturas, uma diminuição da atividade psicomotora e sedação. Existem ainda outros efeitos como fortes dores de cabeça (Le Boisselier et al., 2016)
- Efeitos musculares: Mialgia, espasmos musculares, rigidez muscular (Tournebize, Gibaja e Kahn, 2016)
- Efeitos a nível de balanço metabólico: Distúrbios eletrolíticos, hipoglicémia, hipertermia (Tournebize, Gibaja e Kahn, 2016)

4.7. Dependência

Um dos efeitos crónicos dos canabinóides sintéticos é a síndrome de dependência, que se desenvolve uma em cada dez pessoas que consomem CS (Alves, Spaniol e Linden, 2012). Os canabinóides sintéticos têm um potencial aditivo elevado, causando uma elevada dependência psíquica e uma dependência física moderada (Funada, 2016). Normalmente, a dependência ocorre com o uso concomitante e crónico de altas doses destes canabinóides (Funada, 2016).

O primeiro indivíduo a experienciar um caso de dependência com canabinóides sintéticos tinha 20 anos e consumiu CS durante oito meses pois sentia-se relaxado, sedado e sentia os mesmos efeitos que com o consumo da canábis. Depois de deixar de consumir, teve sintomas como diaforese (transpiração excessiva), tremores, dor de cabeça, palpitações,

insónias, taquicardia, hipertensão, hiperventilação, diarreia, náuseas, vômitos, inquietação e depressão (Spaderna, Addy e D'Souza, 2013).

Já em 2009, num estudo de Zimmermann et al., foi descrito um caso em que houve retirada do “Spice” e posteriormente síndrome de abstinência, num indivíduo que ao longo do tempo foi fumando cada vez mais “Spice”, uma vez que a dose inicial já não era suficiente nem causadora dos efeitos iniciais. Quando houve retirada da droga, o indivíduo sentiu-se agitado, com tremores, náuseas, vômitos, dores de cabeça e bastante deprimido (Alves, Spaniol e Linden, 2012), sugerindo que os canabinóides sintéticos causam dependência física que leva a síndrome de abstinência.

4.8. Tratamento de intoxicações agudas

Não existe um antídoto específico para esta classe de drogas, nem guias de tratamento para este género de intoxicações (Fattore, 2018). Desta forma, o tratamento adotado em situações de intoxicação por canabinóides sintéticos consiste normalmente em medidas de suporte, com uma observação do indivíduo, seguido de um tratamento dos sintomas que a vítima apresenta, sintomas que normalmente desaparecem num período de 24 a 48 horas (Freund e Banning, 2017). Aos pacientes que apresentam sintomas como agitação, taquicardia, convulsões, hipertensão são administradas benzodiazepinas como o lorazepam, devido ao seu efeito sedativo, e, em casos de psicose e paranóia são administrados neurolépticos como o haloperidol e a quetiapina (Fattore, 2018). São também utilizados anti-eméticos em casos de náuseas e vômitos associados ao consumo de CS (Freund e Banning, 2017). Para sintomas que persistam, pode optar-se pela terapia electroconvulsiva (Freund e Banning, 2017). Em teoria, os antagonistas dos recetores de CB₁ podem ajudar no tratamento sintomático de intoxicações, mas não existe até hoje nenhuma medicação com atividade antagonista para o recetor CB₁ (Fattore, 2018).

V. CANABINÓIDES SINTÉTICOS EM TOXICOLOGIA FORENSE

5.1. A importância dos canabinóides sintéticos em contexto forense

O estudo dos canabinóides sintéticos assume grande importância em Toxicologia Forense, uma vez que existem alguns casos de morte associado ao consumo destas substâncias, sendo a área de maior risco a toxicidade comportamental que resulta em comportamentos de delírio e traumas. Em pessoas com doenças cardiopulmonares, este é um fator que, juntamente com o consumo de CS, contribui para a morte (Labay et al., 2018).

Na investigação toxicológica *post mortem* importa apurar a presença ou ausência de canabinóides sintéticos através de testes toxicológicos (Labay et al., 2018).

Outra área onde o consumo destas drogas assume relevância é no âmbito da fiscalização da condução rodoviária. Indivíduos que conduzem sob a influência de canabinóides sintéticos apresentam normalmente confusão, desorientação, discurso incoerente e lento, podendo também apresentar uma resposta nula da pupila (Chase et al., 2016).

5.2. Investigação toxicológica

A investigação toxicológica *post mortem* tem como objetivo deliberar se as substâncias presentes no organismo, neste caso os canabinóides sintéticos, foram a causa da morte ou se contribuíram para esse fim. Para tal, é necessário recolher informação relativa ao caso, realizar a colheita das amostras biológicas (e eventualmente não biológicas presentes no local), tendo sempre em consideração o tempo decorrido entre a morte e a recolha, e posteriormente fazer-se a análise toxicológica propriamente dita e a interpretação dos resultados (Cooper e Negrusz, 2013).

5.2.1. Recolha, envio, conservação e armazenamento da amostra

A etapa da recolha, envio e conservação das amostras assume grande importância na investigação toxicológica, exigindo alguns cuidados para garantir a integridade da mesma.

Em geral, as amostras mais utilizadas para análise toxicológica *post mortem* são o sangue e a urina. A amostra de cabelo é utilizada fundamentalmente para distinguir um consumo crónico de um consumo ou exposição ocasional ao canabinóide sintético. Quando se trata de amostras como sangue e urina, a colheita deve ser feita o mais rapidamente possível depois da descoberta do corpo, para evitar a presença de interferências (Skopp, 2004). A recolha da amostra de urina deve ser feita num prazo máximo de 120 horas depois do consumo da droga, uma vez que a droga pode ser eliminada da urina em 4 ou 5 dias no caso de ter um tempo de semi-vida curto. A amostra de sangue, por permitir uma janela de deteção mais curta, deve ser colhida num prazo máximo de 48 horas (Humbert, Hoizeu e Lhermittle, 2014).

Os frascos onde são colocadas as amostras devem ser limpos e estéreis para evitar contaminações que interfiram na posterior análise da amostra. Os frascos devem ainda coincidir com o tamanho da amostra a recolher, uma vez que assim consegue-se diminuir os riscos de perdas por volatilização e oxidação. No final da recolha, o frasco da amostra deve ser devidamente identificado (Skopp, 2004)

No que diz respeito ao armazenamento da amostra, este vai depender da amostra em questão. Se a amostra for saliva, esta deve ser armazenada a 4°C durante 1 a 4 semanas ou a -20°C durante 4 a 24 semanas (Lee et al., 2012). Se a amostra for urina deve ser armazenada a 4°C até ser analisada (Humbert, Hoizeu e Lhermittle, 2014).

5.2.2. Redistribuição *post mortem*

Muitas drogas são sequestradas em certos compartimentos do corpo humano antes da morte. No entanto, após a morte, a droga concentrada nestes órgãos (reservatórios) é redistribuída para outros locais. A este fenómeno chama-se redistribuição *post mortem* (RPM) (Pélissier-Alicot et al., 2003). A redistribuição *post mortem* ocorre normalmente com drogas de alta lipofilicidade, que têm um grande volume de distribuição, como é o caso dos canabinóides sintéticos (Holland et al., 2011).

A RPM dificulta a interpretação dos resultados uma vez a concentração do canabinóide sintético determinada *post mortem* pode não corresponder à concentração deste no momento da morte (Cooper e Negrusz, 2013; Drummer, 2004). Como os canabinóides sintéticos são drogas com elevada lipofilia, este processo torna-se muito significativo (Pamplona, 2014).

Num estudo de Zaitzu et al., foram quantificados os metabolitos do canabinóide sintético MAM-2201 no plasma, que revelou diferenças entre as concentrações plasmáticas *post mortem* cardíacas e femorais do composto-pai e dos metabolitos, o que sugere uma redistribuição *post mortem* do composto e dos seus metabolitos. No caso, as concentrações plasmáticas cardíacas foram de 1,5 a 5,5 vezes mais elevadas comparativamente às do sangue femoral (Zaitzu et al., 2015).

Compostos lipofílicos alcalinos como os canabinóides sintéticos com um grande volume de distribuição normalmente apresentam uma redistribuição *post mortem* (Zaitzu et al., 2015).

5.2.3. Estabilidade química e metabólica

É de extrema importância a avaliação da estabilidade dos canabinóides sintéticos nas matrizes biológicas pelos laboratórios de Toxicologia Forense (Fort et al., 2017). A estabilidade das drogas é normalmente influenciada por vários fatores, como as

propriedades físico-químicas da droga, características da amostra, entre outros (Peters, 2007).

Em casos *post mortem*, ocorre decomposição e invasão microbiana, o que pode levar a uma degradação mais rápida dos analitos, Mesmo após a morte, as enzimas podem continuar a metabolizar e degradar a droga (Holmgren et al., 2004).

Foram realizados estudos para avaliar a estabilidade de alguns canabinóides sintéticos que permitiram demonstrar que as amostras contendo canabinóides sintéticos devem ser refrigeradas para prevenir perdas por degradação (Fort et al., 2017).

Num estudo de Kneisel e Auwarter, numa amostra de sangue, foi avaliada a estabilidade do analito fazendo três ciclos de congelação durante 21h e um degelo de 1h, e a -20°C durante 14 dias. Em nenhum dos casos de notou instabilidade dos analitos (Kneisel e Auwarter, 2012). Mesmo durante um mês a -20°C, uma amostra de sangue mantém a sua estabilidade (Ammann et al., 2012).

Num estudo recente realizado por Labay et al. foram detetados numa amostra de sangue vários canabinóides sintéticos e as respetivas concentrações são apresentadas na tabela 3 (Labay et al., 2016).

Numa amostra de urina, o JWH-018 aparece normalmente em concentrações de 0,05 a 0,10 ng/mL, ao contrário do que acontece em amostras de sangue, onde as concentrações são superiores. Já o JWH-210 4-OH-pentilo tem sempre uma concentração inferior a 0,05 ng/mL (Franz et al., 2017).

No caso do canabinóide sintético PB-22 E 5F-PB-22, este demonstrou alguma degradação devido à instabilidade das ligações éster na sua estrutura (Aldlgan e Torrance, 2016).

Canabinóides sintéticos	Concentração sanguínea	Tipo de caso	Referência
JWH-122	9,14 ng/mL	Condução rodoviária	Chase et al., 2018
JWH-203	0,18 ng/mL		
JWH-018	0,2 ng/mL	Condução rodoviária	Chase et al., 2016
AM-2201	4,6 ng/mL		
JWH-022	>0,1 ng/mL		
RCS-4	12 ng/mL	Condução rodoviária	Chase et al., 2016
JWH-081	0,73 ng/mL		
JWH-122	0,35 ng/mL	Condução rodoviária	Jaenicke et al., 2018
JWH-210	1,06 ng/ml	Condução rodoviária	Jaenicke et al., 2018
JWH-122	0,44 ng/mL		
JWH-122	1,2 ng/mL	Condução rodoviária	Jaenicke et al., 2018
JWH-018	0,76 ng/mL		
JWH-250	2,94 ng/mL		
JWH-122	9,53 ng/mL	Condução rodoviária	Jaenicke et al., 2018
JWH-250	0,91 ng/mL		
AM-2201	17 ng/mL	Fatal (<i>post mortem</i>)	Labay et al., 2016
JWH-018	0,47ng/mL		
AM-2201	0,21 ng/mL	Fatal (<i>post mortem</i>)	Labay et al., 2016
JWH-018	0,65 ng/mL		
JWH-122	>0,1 ng/mL		
JWH-1210	>0,1 ng/mL		
Δ 9-THC	1,1 ng/mL		
Etanol	0,15 g/L		

Tabela 3. Casos de canabinóides sintéticos encontrados em diferentes amostras de sangue e respectivas concentrações (Chase et al., 2016; Jaenicke et al., 2018 e Labay et al., 2016).

Em casos fatais, as concentrações de alguns canabinóides sintéticos no sangue são geralmente:

- 0,1-199 ng/mL para o JWH-018 (Shanks, Dahn e Terrell, 2012)
- 0,1-68,3 ng/mL para o JWH-073 (Shanks, Dahn e Terrell, 2012)
- 12 ng/mL para o AM-2201 (Patton et al., 2013)
- 1,1-1,5 ng/mL para o 5F-PB-22 (Behonick et al., 2014)

No entanto, estes valores podem nem sempre corresponder a casos letais, uma vez que a associação com outros canabinóides sintéticos ou outros fatores como o etanol podem interferir.

5.2.4. Matrizes biológicas empregues na análise de canabinóides sintéticos

A deteção de canabinóides sintéticos é desafiante, principalmente devido ao facto das concentrações dos mesmos no organismo humano serem baixas (Castaneto et al, 2015). Também existem agentes naturais, como é o caso do tocoferol (vitamina E) e ácidos gordos, que são adicionados às misturas herbáceas com o objetivo de interferir com a deteção dos canabinóides sintéticos nos métodos de rastreio (Dresen et al, 2011).

Uma vez que os canabinóides sintéticos são drogas recentes, as matrizes biológicas empregues são as habituais (sangue, urina, saliva e cabelo), havendo ainda pouco estudos com outras amostras como a biliar, por exemplo.

5.2.4.1. Urina

A urina é uma das matrizes preferidas para análises toxicológicas, uma vez que as drogas estão mais concentradas na urina do que no plasma, o que prolonga a sua janela de deteção (Liu et al., 2018). No entanto, a análise desta amostra requer um conhecimento maior acerca dos metabolitos das drogas (Clauwaert et al., 2001).

A urina é uma boa amostra tanto para testes de drogas *ante mortem* como *post mortem*, por ser uma matriz simples. Porém, a quantidade de droga presente na urina é influenciada por vários fatores, como o volume urinário, o metabolismo, a clearance e o pH (Clauwaert et al., 2001).

Em geral, os compostos-pai não estão presentes na urina em quantidades detetáveis. Isto mostra a importância que existe na identificação do maior número possível de metabolitos desses compostos (Presley et al, 2016). Os metabolitos hidroxilados e carboxilados dos canabinóides sintéticos são os mais prevalentes na urina (Barnes et al., 2018).

A preparação deste tipo de amostra é normalmente feita por hidrólise ácida, básica ou enzimática, sendo esta última a mais comum.

A urina como matriz biológica na deteção de canabinóides sintéticos tem vantagens pelo facto de ser uma amostra de fácil recolha, ter uma grande janela de deteção e haver a possibilidade de recolha de grande volume de amostra. No entanto, nesta amostra praticamente não são detetados os compostos-pai, apenas os metabolitos formados e não é uma amostra útil na análise quantitativa (Kerrigan, 2011).

5.2.4.2. Sangue

O sangue pode providenciar informação acerca das concentrações da droga. Os canabinóides sintéticos são facilmente detetáveis no sangue, tanto os compostos-pai como os seus metabolitos (Berankova et al., 2006).

Utilizando o sangue *ante mortem* como amostra é possível avaliar o uso recente da droga e esta é uma amostra que não é facilmente adulterada. No entanto, apresenta limitações devido à apertada janela de deteção e a colheita de sangue ser mais invasiva. No caso da amostra biológica ser o sangue *post mortem*, o volume de sangue periférico já é limitado e a amostra é suscetível de contaminação. Neste caso, a qualidade da amostra vai depender bastante do procedimento de recolha (Kerrigan, 2011).

5.2.4.3. Saliva

Um outro tipo de amostra utilizada na deteção de canabinóides sintéticos é a saliva ou fluido oral. Esta pode ser colhida de forma não invasiva através da expetoração, por aspiração ou por vácuo. Os tempos de deteção nesta amostra são comparáveis aos do sangue, ou seja, relativamente curtos (Crouch, 2005).

A saliva é uma boa matriz para a análise de CS uma vez que indica o uso recente da droga. É uma amostra que se encontra facilmente disponível e é de colheita fácil, e nela são detetados os compostos-pai. Para além disso, é apenas necessária uma preparação mínima da amostra. Porém, o tempo de deteção dos CS nesta amostra é curto e o volume da amostra é pequeno. Além disso, podem existir interferências por contaminação oral e o método de recolha pode influenciar o pH da amostra (Kerrigan, 2011).

5.2.4.4. Cabelo

No que diz respeito ao cabelo, esta matriz permite obter informação retrospectiva da exposição à droga, ou seja, permite estimar o período em que o indivíduo fez uso da substância (história de consumo de drogas no passado). Isto deve-se ao facto da sua janela de deteção ser grande, ou seja, permite detetar as drogas por um período de tempo mais longo (dependendo do comprimento do cabelo) que as restantes matrizes (Kintz et al., 2006). Permite ainda a diferenciação entre consumo ocasional e uso crónico das substâncias (Kerrigan, 2011).

O método de preparação das amostras de cabelo consiste em remover os contaminantes, seguindo-se uma extração com solventes. Esta preparação pode ser realizada lavando o cabelo com água, acetona e éter petróleo. Depois disso, a amostra de cabelo é seca, cortada em pedaços e extraída com etanol (Znaleziona et al., 2015).

O cabelo como matriz biológica na deteção de canabinóides sintéticos tem vantagens pela facilidade de recolha desta amostra, que não requer condições especiais de

armazenamento e permite obter o historial do uso da droga no passado. Apesar de fornecer informação acerca do uso crónico da droga, tem limitações na avaliação do uso recente das mesmas. Para além disso, podem existir interferências devido a contaminação ambiental (Kerrigan, 2011).

5.2.5. Preparação da amostra

Os canabinóides sintéticos podem ser detetados em matrizes não biológicas, como as misturas de ervas e pós químicos, e em matrizes biológicas como a urina, sangue, cabelo, saliva e tecidos. Cada tipo de amostra requer uma preparação própria.

Normalmente os compostos-pai dos canabinóides sintéticos são detetados no cabelo, no sangue e na saliva, enquanto na urina apenas se detetam os seus metabolitos principais (Znaleziona et al, 2015).

5.2.5.1. Hidrólise enzimática

Os canabinóides sintéticos são extensivamente metabolizados e os metabolitos de fase II são quase exclusivamente glucuronídeos, o que faz com que a hidrólise seja uma etapa obrigatória em amostras de urina analisadas por espetrometria de massa para detetar os metabolitos de fase I (Diao e Huestis, 2016).

Uma hidrólise mais completa requer uma hidrólise enzimática seguida de uma hidrólise alcalina para poder quebrar as ligações éter existentes nos glucuronídeos canabinóides (Sempio, 2017). No entanto, esta técnica requer uma preparação laboriosa da amostra, envolvendo muitos passos e uma maior limpeza da amostra por extração líquido-líquido ou em fase sólida. A hidrólise alcalina normalmente é feita com hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio, sendo este tipo de hidrólise menos dispendiosa, porém apenas quebra glucuronídeos com ligações éster (Sempio, 2017).

Uma incubação longa e altas temperaturas de incubação não melhoram a eficiência da hidrólise (Sempio, 2017).

5.2.5.2. Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido (LLE) é normalmente utilizada para a extração de canabinóides sintéticos em matrizes biológicas devido à elevada lipofilia destas drogas (Namera et al, 2015). Esta técnica consiste em dois solventes imiscíveis, normalmente uma solução aquosa e um solvente orgânico (Zhang et al., 2016). Esta extração é feita pela adição de um solvente orgânico imiscível na matriz (como o clorofórmio) seguida de agitação que promove a passagem do analito para o solvente orgânico. São então formadas duas fases líquidas que são separadas (Namera et al, 2015).

Uma extração líquido-líquido alcalina pode ser feita com uma mistura de n-hexano/etilacetato (90:10), sendo este o solvente mais utilizado (Znalezniona et al, 2015), podendo também ser feita apenas com hexano ou outros solventes ou mistura de solventes. A vantagem de uma extração alcalina prende-se com o facto dos canabinóides sintéticos terem carácter básico como pode ser verificado pelas suas estruturas com os grupos amina (Fort et al., 2017), que ao alcalinizarem ficam na forma não ionizada, que por sua vez é solúvel em solventes orgânicos (Mohamed, 2017). Num estudo de Kneisel et al, foram analisadas 833 amostras de sangue onde foi detetada a presença de 30 canabinóides sintéticos. A preparação incluiu uma extração líquido-líquido alcalina feita com uma mistura de n-hexano/etilacetato numa proporção de 99:1. Já num outro estudo, de Ammann et al., foi realizada uma extração similar para amostras de sangue com 1-clorobutano com 10% de isopropanol (Znalezniona et al., 2015) e noutro estudo, após uma hidrólise enzimática, foi feita uma extração líquido-líquido usando como solvente orgânico uma mistura de 1-clorobutano com álcool isopropílico (70:30), com vista a identificar e quantificar por LC-MS-MS 32 metabolitos de canabinóides sintéticos (Borg, Tverdovsky e Stripp, 2016). Num estudo de Fort et al., foi analisada uma amostra de sangue e procedeu-se a uma extração alcalina líquido-líquido usando como solvente uma

mistura de n-hexano/etilacetato numa proporção 80:20, sendo as concentrações extraídas de canabinóides sintéticos de 30 ug/mL.

Este tipo de extração é bastante utilizado em toxicologia forense para a deteção de drogas de abuso, sendo a maioria dos compostos mais solúveis no solvente orgânico do que na água, e, portanto, uma extração direta é adequada para a separação do analito (Zhang et al., 2016). A escolha do solvente é realizada com base na polaridade, sendo que normalmente solventes polares extraem analitos polares mais eficientemente do que analitos apolares. Para extrair um grande número de analitos, é importante que haja uma combinação de solventes com várias polaridades, daí o uso de combinação de solventes em alguns casos (Humbert, Hoizei e Lhermittle, 2014).

5.2.5.3. Extração em fase sólida

Uma extração em fase sólida é baseada na partição de um soluto entre a fase móvel líquida e a fase estacionária sólida (Humbert, Hoizei e Lhermittle, 2014). No caso de uma extração deste tipo, a amostra passa pelo material extrator por aplicação de pressão numa das extremidades. Neste processo recupera-se quase todo o analito da matriz numa única extração. Após a retenção do analito pelo adsorvente da coluna e eliminação dos interferentes por lavagens sucessivas, faz-se a eluição do composto de interesse com pequenos volumes de um solvente adequado.

Este tipo de extração é normalmente mais dispendiosa que a LLE. No entanto, tem algumas vantagens como o baixo consumo de solvente e a maior eficácia na eliminação de interferentes. É usada normalmente para fluidos biológicos de modo a purificar e concentrar os analitos na amostra e conseguir melhores resultados na análise por espetrometria de massa (Znaleziona et al, 2015).

Num estudo de Presley et al., vários canabinóides sintéticos e os seus metabolitos foram extraídos usando uma extração em fase sólida: o CP 47,497 foi detetado na saliva por LC-

MS/MS, o JWH-018 detetado no sangue por HPLC-MS/MS, assim como um metabolito do CS PB-22 foi detetado na urina (Presley et al., 2016).

5.2.5.4. Extração líquido-líquido assistida por *salting-out*

A extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (SALLE) é um tipo de extração líquido-líquido envolvendo água e solventes orgânicos miscíveis com água, em que a separação das fases é induzida pelo efeito de *salting-out*. O solvente normalmente utilizado é o acetonitrilo (Ramos, Valente e Rodrigues, 2014). O processo de *salting-out* consiste na adição de um eletrólito (como por exemplo o cloreto de sódio) a uma solução aquosa de forma a modificar o coeficiente de distribuição de um dado soluto entre duas fases podendo alterar as forças de solvatação entre os solutos e a água. Esta metodologia apresenta um conjunto de vantagens importantes, entre as quais se destacam a simplicidade, baixo custo, baixa utilização de solventes e a possibilidade de ser aplicada a outros analitos de diferentes polaridades, relativamente às aplicações possíveis através da extração líquido-líquido clássica (Ramos, Valente e Rodrigues, 2014).

Esta técnica mostrou ser capaz de extrair uma variedade de compostos das matrizes biológicas, incluindo compostos polares que são difíceis de extrair por LLE ou SLE. A técnica SALLE usa menos solventes que as restantes mencionadas, e não existe necessidade de uma agitação vigorosa de forma a promover a recuperação do solvente orgânico porque este é miscível com a água. Esta técnica é também menos laboriosa e mais económica, quando comparada com a extração em fase sólida (Tang e Weng, 2013).

5.2.6. Métodos de análise

Atualmente, torna-se crucial desenvolver métodos analíticos para se proceder a uma identificação qualitativa e a uma quantificação dos canabinóides sintéticos no sangue e relacionar com os seus metabolitos na urina. Como os canabinóides sintéticos estão constantemente a sofrer conversão metabólica, tanto a amostra de sangue como de urina têm um papel muito importante na análise forense de CS. A análise da amostra de sangue

aumenta a probabilidade de identificar os compostos-pai ingeridos. Para a análise dos canabinóides sintéticos, em primeiro lugar usam-se métodos de rastreio seguidos de métodos de confirmação (Knittel et al., 2016).

5.2.6.1. Métodos de rastreio

Os imunoensaios são normalmente os primeiros testes aplicados na deteção de canabinóides sintéticos que tenham estruturas químicas semelhantes entre si. São testes qualitativos ou semi-quantitativos, que detetam a presença ou ausência de substâncias (Liu et al., 2018).

Os imunoensaios mais vulgarmente utilizados na deteção de canabinóides sintéticos são a ELISA e o HEIA. São testes rápidos, sensíveis e de custo reduzido (Liu et al., 2018).

Como já referido, as estruturas dos vários canabinóides sintéticos são muito heterogéneas e estão constantemente a evoluir, pelo que se torna difícil fazer a deteção dos canabinóides sintéticos recorrendo aos imunoensaios enzimáticos. À exceção daqueles que são análogos do THC, como o HU-210, as estruturas podem não se assemelhar à do THC e, por esse motivo, poderão não desencadear um resultado positivo em imunoensaios para deteção de canabinóides em urina (Schneir, Cullen e Ly, 2011).

Os imunoensaios usam os anticorpos desenvolvidos para que estes reajam com os epítomos nos compostos marcados, para detetar as drogas e os seus metabolitos (Liu et al., 2018). A técnica HEIA tem por base o princípio da competitividade do anticorpo e as interações droga-enzimas. O anticorpo policlonal e o conjugado droga-enzima estão nas soluções e não precisam de etapas de lavagem ou longos períodos de incubação como acontece nos ensaios ELISA. Portanto, esta técnica tem como vantagem o facto de não necessitar de grande preparação da amostra e de ter alto rendimento (Barnes et al., 2018).

A maior parte dos imunoensaios para rastreio de canabinóides sintéticos são desenvolvidos marcando os metabolitos hidroxilados ou ácidos carboxílicos dos compostos-pai (Presley et al, 2016).

Em algumas técnicas, o que acontece é que os anticorpos podem não ter reatividade cruzada suficiente para os metabolitos da nova geração de canabinóides sintéticos. E assim não se ligam com grande afinidade aos metabolitos da nova geração, e estes não são detetados (Franz et al., 2017). Isto é, os canabinóides, bem como os seus metabolitos, podem reagir com os anticorpos, aumentando a eficácia do método em detetar a droga (Barnes et al., 2018).

Os testes de reatividade cruzada podem nem sempre funcionar, porque existem variações interindividuais e específicas das substâncias, pelo que a reatividade cruzada não é garantida e apenas um pequeno número de metabolitos estão disponíveis puros (Franz et al, 2017). Existem também interferências que fazem com que estes testes falhem, como é o caso das drogas de abuso comuns, a coadministração de outras drogas, e até compostos com estrutura semelhante.

Os imunoensaios são amplamente utilizados pois apresentam vantagens como um tempo de resposta curto e possibilidade de detetar várias drogas da mesma classe. No entanto, para estes ensaios é sempre necessário realizar um teste de confirmação para a confirmação definitiva da presença da droga ou dos seus metabolitos, o que usualmente se faz por técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massa (Liu et al., 2018; Barnes et al., 2018), que são apresentadas em seguida. Isto porque os imunoensaios apresentam sensibilidade e especificidade limitadas, o que pode levar a que hajam resultados falsos positivos ou falsos negativos. Por esta razão, são considerados presuntivos os resultados positivos nos testes de reatividade cruzada de anticorpos (Liu et al., 2018).

5.2.6.2. Métodos de confirmação

5.2.6.2.1. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) era inicialmente usada como o melhor método padrão para os testes toxicológicos. A separação cromatográfica de fase gasosa acontece num forno aquecido, e, portanto, os analitos devem ser pequenos e não devem ser polares, para que detenham a sua termoestabilidade e volatilidade (Liu et al., 2018). Compostos termolábeis podem-se decompor, e compostos com um grupo polar (como um grupo amino ou hidroxilo) podem causar uma interação entre o composto e a fase estacionária, o que leva a uma fraca deteção do analito (Aldlgan e Torrance, 2016).

A GC-MS reflete as estruturas dos canabinóides sintéticos. As amostras, no estado gasoso, provenientes do cromatógrafo gasoso são bombardeadas por eletrões e são fragmentadas dando origem a iões positivos, negativos e radicais, e a partir da diferença de m/z dos iões gerados, estes são separados. Ou seja, estudam-se as vias de fragmentação dos diferentes grupos de canabinóides sintéticos, e posteriormente a identificação destes é feita comparando os espectros obtidos com as bases de dados já existentes (Namera et al, 2015).

Um fator limitante da análise por CG é que alguns canabinóides sintéticos podem sofrer degradação térmica (Namera et al, 2015).

Num estudo de Leal, foram analisados 33 produtos por GC-MS, entre os quais 23 continham canabinóides sintéticos. As amostras foram dissolvidas em metanol e como gás de arraste foi utilizado o hélio. A temperatura estava inicialmente a 240°C (durante 1 minuto), aumentando cerca de 6°C por minuto até atingir os 330°C, mantendo-se esta temperatura durante 4 minutos. Por GC-MS foi possível detetar que nestas substâncias

estavam presentes 10 canabinóides sintéticos diferentes, e outros interferentes como a vitamina E e a cafeína (Leal, 2015).

5.2.6.2.2. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa

Do mesmo modo que a anterior, na LC-MS/MS também se estuda a fragmentação dos canabinóides sintéticos, tendo a vantagem de eliminar o requisito da volatilidade, o que vai simplificar a preparação da amostra.

A LC-MS-MS está equipada com dois detetores de quadrupolo, onde o primeiro gera iões precursores (ou iões-pai) que entram no segundo detetor, onde vai ocorrer a fragmentação e os iões são produzidos (Liu et al., 2018).

Os iões moleculares protonados são apenas observados por LC-MS, mas a GC-MS obtém mais informação. Por isso se recorre á técnica LC-MS/MS, para que possa ser obtida mais informação que reflita a estrutura química das substâncias. Com a LC-MS/MS é possível a deteção de CS. Este método resolve a reatividade cruzada desde que os metabolitos dos canabinóides sintéticos presentes na urina tenham atividade suficiente nos recetores canabinóides (Franz et al, 2017).

A LC-MS/MS é também uma metodologia útil para detetar os metabolitos dos CS na urina (Znalezion et al, 2015).

Muitas amostras são analisadas por cromatografia líquida devido à sua alta sensibilidade. A cromatografia líquida é normalmente associada à espectrometria de massa, sendo utilizadas técnicas como por exemplo a ionização por eletrospray (ESI) (Znalezion et al, 2015).

A LC-MS-MS tem uma maior especificidade analítica do que a GC-MS. Tendo isto em conta, bem como uma preparação mais simples da amostra, esta tem sido usado no lugar da GC-MS (Liu et al., 2018).

5.2.6.2.3. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS) foi aplicada ao estudo dos compostos-pai, bem como dos metabolitos dos canabinóides sintéticos (Namera et al, 2015). Permite diferenciar compostos com a mesma massa molecular nominal ou parecida, mas diferente composição elementar (Znalezniona et al, 2015), diferenciando entre a massa exata e a massa nominal de cada isótopo.

A LC-HRMS permitiu ultrapassar a limitação da LC-MS/MS no que concerne a deteção de canabinóides sintéticos, uma vez que esta última necessita de espectros de massa para identificação dos compostos (Pon e Fenyvesi, 2018).

5.3. Estudo de casos forenses

Caso #1. Um rapaz de 18 anos matou a sua tia, em frente à sua mãe. Quando interrogado pela polícia, o jovem não soube explicar porque o fez. Alegou não ter consciência dos seus atos e afirmou que quando viu a faca na cozinha imaginou-se a pegar nela e foi o que realmente fez. Não sabe quão profundo feriu a tia com a faca, lembrando-se apenas de sair do local com a faca na mão e arrepender-se de tudo. Embora tenha consumido anteriormente canabinóides sintéticos, foi a primeira vez que lhe aconteceu algo semelhante.

O jovem apresentava uma pequena zona eritematosa na região da glândula mamária, pele pálida, produção abundante de expectoração, entre outros sintomas. O suspeito não estava nada comunicativo, apresentava-se com movimentos bastante lentos, a reagir lentamente à luz, com caminhar cambaleante e revelou dificuldade em apanhar objetos do chão.

Admitiu ter comprado a droga através da Internet, sendo que comprou inicialmente dois pacotes, cada um com 10 g. As drogas chamavam-se *Mr Green- No bad trip* e *Old School*. No entanto, continuou a comprar, chegando a consumir 12 pacotes.

Depois de estudado o caso, concluiu-se que o jovem apresentava uma personalidade anormal e descontrolada, desordens psicóticas, vício em substâncias psicóticas, bem como um transtorno de personalidade imatura.

A análise toxicológica foi realizada em sangue do suspeito colhido aproximadamente uma hora e meia após o homicídio. Foi também feito o teste do álcool no sangue, que se revelou negativo. Foi possível concluir através da amostra de sangue que o suspeito, quando cometeu o crime, estava sob o efeito da droga AM-2201, um canabinóide sintético que o levou a ter estas atitudes inconscientes (Rojek et al, 2017).

Caso #2. Um homem de 25 anos, consumidor habitual de álcool e drogas, foi encontrado morto no seu apartamento. Nesse momento o seu rosto tinha tonalidade azulada. Foi apurado que o indivíduo havia bebido muito álcool na noite anterior, tendo este uma concentração de álcool no sangue de 2,60 g/kg e uma concentração urinária de 3,58 g/kg. A autópsia revelou edema cerebral, edema pulmonar, e congestão aguda nos órgãos internos, bem como hemorragias petequiais nas pálpebras, face e pulmões (Angerer et al, 2017).

Uma análise ao sangue femoral por HPLC-MS/MS detetou a presença do canabinóide sintético 5F-PB-22 numa concentração de 0,37 ng/mL. Em amostras de urina foram detetados os seus metabolitos 5F-PB-22 3-carboxindol, PB-22 5-hidroxi-pentilo e ácido PB-22-5-pentanóico.

Segundo os estudos de Behonick et al (2014), a concentração letal para este composto (5F-PB-22) é de 1,1 a 1,5 ng/mL. No entanto, uma concentração menor pode levar à morte, principalmente se associada ao consumo de etanol, que pode potenciar os efeitos da droga.

Depois da realização da autópsia médico-legal e da análise toxicológica, chegou-se à conclusão que o efeito do canabinóide sintético, concomitantemente com o efeito do álcool, conduziu a vários efeitos adversos, sendo o mais grave o bloqueio das vias aéreas superiores, que levou à morte por asfixia (Angerer et al, 2017).

Caso #3. Um homem de 28 anos com historial de consumo de álcool e drogas foi encontrado morto. A autópsia realizada ao seu corpo revelou edema cerebral e pulmonar.

O indivíduo apresentou uma concentração de álcool no sangue de 1,45 g/kg e uma concentração urinária de 2,57 g/kg. Analisou-se a amostra de sangue femoral por HPLC-MS/MS, que revelou a presença do canabinóide sintético AB-CHMINACA numa concentração de 4,1 ng/mL. Foi igualmente analisada a amostra de urina, tendo sido encontrados os metabolitos do mesmo composto.

A concentração de canabinóide sintético neste caso é inferior a casos clínicos de intoxicação reportados noutros estudos. No entanto, também neste caso não se exclui a possibilidade do álcool potenciar o efeito da droga (Angerer et al, 2017).

Caso #4. Uma mulher de 42 anos foi vista com vida pela última vez pelas nove e meia da manhã de um determinado dia. Nessa hora, teve vômitos e diarreia. Cerca de duas horas depois, a mulher já não respondia a qualquer estímulo. Tinha historial de alcoolismo e a família afirmou que a vítima consumia CS, tendo fumado “Spice” e bebido álcool na noite anterior.

A autópsia revelou fígado gordo e doença pulmonar obstrutiva crónica. A análise toxicológica realizada numa amostra de sangue da vítima detetou os seguintes canabinóides sintéticos: AM-2201 numa concentração de 2,8 ng/mL e JWH-018 numa concentração de 0,11 ng/mL.

Foi declarada como causa de morte uma intoxicação por canabinóides sintéticos (Labay et al, 2016).

Caso #5. Um homem de 29 anos com historial de drogas de abuso foi mandado parar durante uma operação stop para controlo de drogas.

No carro foram encontrados pacotes de canabinóides sintéticos, com o nome comercial de “BooM” e “OMG”. Foi feita uma análise toxicológica ao sangue do condutor recolhido cerca de 50 minutos mais tarde. O médico relatou que o suspeito apresentava as pupilas dilatadas e com uma reação lenta à luz, tonturas e estímulos lentos.

A análise toxicológica revelou a presença de JWH-120 numa concentração de 6,2 ng/mL e JWH-122 numa concentração de 1,0 ng/mL, não representando estas concentrações sinal de intoxicação (Musshoff et al., 2013).

VI. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os canabinóides sintéticos são compostos químicos que mimetizam a ação do Δ^9 -tetrahydrocannabinol, tendo sido desenvolvidos para uso farmacológico e, mais recentemente, como drogas recreativas. O consumo destas drogas constitui uma das grandes preocupações quer dos governos quer das entidades internacionais responsáveis pelo acompanhamento e regulação da problemática das drogas. Os seus efeitos fisiológicos e psicoativos são semelhantes aos do THC, mas com maior intensidade e toxicidade devido ao seu mecanismo de ação como agonista total dos recetores canabinóides CB₁ e CB₂.

Os canabinóides sintéticos assumem grande importância em Toxicologia Forense uma vez que nos últimos anos foram relatados vários casos de morte associadas ao consumo destas substâncias e, nos casos *ante mortem*, alterações drásticas de comportamento. Devido aos diversos efeitos adversos que estes compostos têm a nível neurológico, cardiovascular, psiquiátrico, cerebrovascular, renal, pulmonar, muscular, entre outros, são então objeto de estudo.

O crescente número de canabinóides sintéticos e a sua diversidade química torna este grupo de substâncias particularmente difícil de detetar, sendo este o grande desafio destas drogas. Além disso, existem poucos dados relativos ao metabolismo dos canabinóides sintéticos. Mesmo com o conhecimento dos metabolitos de alguns compostos-pai, existem metabolitos que podem corresponder a mais do que um canabinóide sintético, pelo que se torna difícil por vezes saber de que CS se trata.

As matrizes biológicas mais comumente utilizadas na análise e deteção de canabinóides sintéticos (sangue, urina, saliva e cabelo), associadas à alta tecnologia dos métodos cromatográficos, com alta sensibilidade, permitem fazer uma avaliação qualitativa e quantitativa destas drogas mesmo que estas se encontrem em concentrações consideradas baixas. No entanto, existem fatores como a redistribuição *post mortem* da droga de uns

tecidos para outros, alterando a concentração da droga, que dificultam significativamente a interpretação dos resultados analíticos.

Com este trabalho foi possível reunir informação científica sobre os canabinóides sintéticos, esclarecendo aspetos relativos às investigações forenses. Desta forma, conclui-se que:

1. Os canabinóides sintéticos causam efeitos adversos graves, que não são frequentes aquando do consumo de cânabis. O uso continuado destas substâncias pode originar igualmente dependência física e psíquica.
2. A urina é a matriz mais eficaz na deteção da maioria dos canabinóides sintéticos, excetuando quando se tratam de compostos-pai.
3. O sangue é utilizado para quantificação aquando do uso recente de canabinóides sintéticos, ao contrário da amostra de cabelo, que é uma matriz importante quando se pretende avaliar o uso crónico da droga.
4. As técnicas analíticas mais usadas na análise toxicológica de canabinóides sintéticos são a cromatografia líquida ou gasosa acopladas à espetrometria de massa, sendo a LC-HRMS mais recente e eficiente.
5. Os canabinóides sintéticos não demonstram instabilidade química quando conservados a uma temperatura de -20°C até pelo menos um mês.
6. O uso de canabinóides sintéticos está associado a morbilidade e mortalidade, principalmente se este for consumido concomitantemente com álcool.
7. As concentrações consideradas letais para os canabinóides sintéticos vão sempre ser dependentes do tipo de canabinóide sintético, e da mistura destes num produto.
8. Continua a ser extremamente difícil a análise e deteção de canabinóides sintéticos, devido à constante introdução de novos compostos e de novas classes que não constam das bases de dados dos canabinóides sintéticos. Por esta razão, torna-se crucial a existência de uma monitorização contínua dos canabinóides sintéticos no mercado e dos efeitos causados por estes.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Aldlgan, A. e Torrance, H. (2016). Bioanalytical methods for the determination of synthetic cannabinoids and metabolites in biological specimens. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80, pp.444-457.
- Alves, A., Spaniol, B. e Linden, R. (2012). Canabinóides sintéticos: drogas de abuso emergentes. *Archives of Clinical Psychiatry*, 39, pp.142-148.
- Ammann, J. et al. (2012). Detection and Quantification of New Designer Drugs in Human Blood: Part 1 – Synthetic Cannabinoids. *Journal of Analytical Toxicology*, 36, pp. 372-380.
- Angerer, V. et al. (2017). Three fatalities associated with the synthetic cannabinoids 5F-ADB, 5F-PB-22, and AB-CHMINACA. *Forensic Science International*, 281, pp.e9-e15.
- Barnes, A. et al. (2014). Evaluation of a homogeneous enzyme immunoassay for the detection of synthetic cannabinoids in urine. *Forensic Science International*, 241, pp. 27-34.
- Basu, P. et al. (2014). Review article: the endocannabinoid system in liver disease, a potential therapeutic target. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 39, pp.790-801.
- Behonick, G. et al. (2014). Four postmortem case reports with quantitative detection of the synthetic cannabinoid, 5F-PB-22. *Journal of Analytical Toxicology*, 38, pp. 559-562.
- Berankova K et al. (2006). Gamma-hydroxybutyric acid stability and formation in blood and urine. *Forensic Science International*, 161, pp.158–162.
- Borg, D., Tverdovsky, A. e Stripp, R. (2016). A Fast and Comprehensive Analysis of 32 Synthetic Cannabinoids Using Agilent Triple Quadrupole LC-MS-MS. *Journal of Toxicology*, 41, pp.1-11.
- Bow, E. e Rimoldi, J. (2016). The Structure-Function Relationships of Classical Cannabinoids: CB1/CB2 Modulation. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 8, pp.17-39.
- Brown, A. (2007). Novel cannabinoid receptors. *British Journal of Pharmacology*, 152, pp.567-575.

- Camilleri, M. (2018). Cannabinoids and gastrointestinal motility: Pharmacology, clinical effects, and potential therapeutics in humans. *Neurogastroenterology & Motility*, 10, pp.13370.
- Castaneto, M. et al. (2015). Synthetic cannabinoids pharmacokinetics and detection methods in biological matrices. *Drug Metabolism Reviews*, 47, pp.124-174.
- Chase, P. et al. (2016). Differential physiological and behavioral cues observed in individuals smoking botanical marijuana versus synthetic cannabinoid drugs. *Clinical Toxicology*, 54, pp. 14-19.
- Clauwaert, KM. et al. (2001). Stability study of the designer drugs 'MDA, MDMA and MDEA' in water, serum, whole blood, and urine under various storage temperatures. *Forensic Science International*. 124, pp.36–42.
- Cooper, G. e Negrusz, A. (2013). Clarke's analytical forensic toxicology. *Pharmaceutical Press*.
- Crews, B. (2013). AACC. [Em linha] (Disponível em <<https://www.aacc.org/publications/cln/articles/2013/february/cannabinoids> > [Consultado em 23 abril 2018].
- Crouch DJ. (2005). Oral fluid collection: the neglected variable in oral fluid testing. *Forensic Science International*, 150, pp.165–173.
- Davidson, C. et al. (2017). Spicing Up Pharmacology: A Review of Synthetic Cannabinoids From Structure to Adverse Events. *Advances in Pharmacology*, 80, pp. 135-168.
- De Brabanter, N. et al. (2013). In vivo and in vitro metabolism of the synthetic cannabinoid JWH-200. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27, pp.2115-2126.
- Deng, H. e Vander Stelt, M. (2017). Chemical tools to modulate 2-arachidonoylglycerol biosynthesis. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65, pp.9-15.
- Diao, X. e Huestis, M. (2016). Approaches, Challenges, and Advances in Metabolism of New Synthetic Cannabinoids and Identification of Optimal Urinary Marker Metabolites. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 101, pp.239-253.
- Dresen, S. et al. (2011). Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitation of synthetic cannabinoids of

the aminoalkylindole type and methanandamide in serum and its application to forensic samples. *Journal of Mass Spectrometry*, 46, pp. 163-171.

Drummer, O.H. (2004). Postmortem toxicology of drugs of abuse. *Forensic Science International*, 142, pp.101-113.

eMedicineHealth. (2018). Marinol (dronabinol) Drug Side Effects, Interactions, and Medication Information [Em linha] Disponível em <https://www.emedicinehealth.com/drug-dronabinol/article_em.htm> [Consultado em 13 março 2018].

Fantegrossi, W. et al. (2014). Distinct pharmacology and metabolism of K2 synthetic cannabinoids compared to Δ^9 -THC: Mechanism underlying greater toxicity? *Life Sciences*, 97, pp.45-54.

Fattore, L. (2018). Synthetic Cannabinoids—Further Evidence Supporting the Relationship Between Cannabinoids and Psychosis. *Biological Psychiatry*, 79, pp. 539-548.

Fattore, L. e Fratta, W. (2011). Beyond THC: The New Generation of Cannabinoid Designer Drugs. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5.

Fort, C. et al. (2017) Stability of Synthetic Cannabinoids in Biological Specimens: Analysis Through Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 41, pp.360-366.

Franz, F. et al. (2017). Immunoassay screening in urine for synthetic cannabinoids – an evaluation of the diagnostic efficiency. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 55, pp.1375-1384.

Freund, S. e Banning, A. (2017). Synthetic cannabinoids: A review of the clinical implications of a new drug of choice. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*, 30, pp.1-4.

Funada, M. (2016). Drug Dependence and Cytotoxicity of Law-evading Drugs: Their Identities Explored from Basic Research. *YAKUGAKU ZASSHI*, 136, pp.65-72.

Gao, Y. e Wang, Y. (2018). Cannabinomimetic Lipidics: From Natural Extract to Artificial Synthesis. *Natural Products and Bioprospecting*, 8, pp.1-21.

Goya, P. e Jagerovic, N. (2000). Recent advances in cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 10, pp.1529-1538.

- Grigoryev, A. et al. (2011). Gas and liquid chromatography-mass spectrometry studies on the metabolism of the synthetic phenylacetylindole cannabimimetic JWH-250, the psychoactive component of smoking mixtures. *Journal of Chromatography B*, 879, pp.2519-2526.
- Hermanns-Clausen, M. et al. (2012). Acute toxicity due to the confirmed consumption of synthetic cannabinoids: clinical and laboratory findings. *Society for the Study of Addiction*, 108, pp.534-544.
- Holland, M. et al. (2011). Postmortem redistribution of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC (11-OH-THC), and 11-nor-9-carboxy-THC (THCCOOH). *Forensic Science International*, 212, pp.247-251.
- Holmgren, P. et al., (2004). Stability of drugs in stored postmortem femoral blood and vitreous humor. *Journal of Forensic Sciences*, 49, pp.820–825.
- Hudson, S. e Ramsey, J. (2011). The emergence and analysis of synthetic cannabinoids. *Drug Testing and Analysis*, 3, pp.466-478.
- Huestis, M. et al. (2017). Impact of Novel Psychoactive Substances on Clinical and Forensic Toxicology and Global Public Health. *Clinical Chemistry*, 63, pp.1564-1569.
- Humbert, L., Hoizey, G. e Lhermittle, M. (2014). Drugs Involved in Drug – Facilitated Crimes (DFC): Analytical Aspects: 1 – Blood and Urine. In: Kintz, P. *Toxicological Aspects of Drug – Facilitated Crimes*. EUA: Elsevier e Book Aid International, 7, pp.159-180.
- Jaenicke, N. et al. (2014). Retrospective analysis of synthetic cannabinoids in serum samples – epidemiology and consumption patterns. *Forensic Science International*, 242, pp.81-87.
- Janikova, B. et al. (2016). New Psychoactive Substances among People Who Use Drugs Heavily in Europe. An inventory of changing drug consumption patterns, shifting drug markets and lagging policy responses. *Adiktologie*, 16, pp.92-105.
- Karila, L. et al. (2017). The Synthetic Cannabinoids Phenomenon. *Current Pharmaceutical Design*, 22, pp.6420-6425.
- Kerrigan, S. (2011). Sampling, storage and stability. In: Moffat, A.C. et al. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 4^aed. Chicago, Pharmaceutical Press, pp.335-354.

- Kintz, P. et al. (2006). Hair analysis for drug detection. *Therapeutic Drug Monitoring*, 28, pp. 442–446.
- Kneisel, S. e Auwarter, V. (2012). Analysis of 30 synthetic cannabinoids in serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry after liquid-liquid extraction. *Journal of Mass Spectrometry*, 47, pp.825-835.
- Knittel, J. et al. (2016). Analysis of Parent Synthetic Cannabinoids in Blood and Urinary Metabolites by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 40, pp.173-186.
- Korenis, P. et al. (2016). Synthetic Cannabis: What Doctors Need to Know. *MOJ Addiction Medicine & Therapy*, 2, pp.24-26.
- Labay, L. et al. (2016). Synthetic cannabinoid drug use as a cause or contributory cause of death. *Forensic Science International*, 260, pp.31-39.
- Le Boisselier, R. et al. (2016). Focus on cannabinoids and synthetic cannabinoids. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 101, pp.220-229.
- Leal, C. (2015). Mass Spectrometry Library of NPS: Isolation and Characterisation of Designer Drugs from Herbal Incenses and Plant Feeders. Lisboa: Universidade de Lisboa.
- Lee, D. et al. (2012). Cannabinoid Stability in Authentic Oral Fluid after Controlled Cannabis Smoking. *Clinical Chemistry*, 58, pp.1101-1109.
- Lessa, M., Cavalcanti, I. e Figueiredo, N. (2016). Cannabinoid derivatives and the pharmacological management of pain. *Revista dor*, 17, pp.47-51.
- Liu, L. et al. (2018). Newly Emerging Drugs of Abuse and Their Detection Methods. *American Journal of Clinical Pathology*, 149, pp-105-116.
- Mechoulam, R. e Hannus, L. (2000). A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chemistry and Physics of Lipids*, 108, pp.1-13.
- Meyer, M. (2018). Toxicokinetics of NPS: Update 2017. In: Meyer, M. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp.1-19.
- Mills, B., Yepes, A. e Nugent, K. (2015). Synthetic Cannabinoids. *The American Journal of the Medical Sciences*, 350, pp.59-62.
- Minns, A. (2013). Synthetic Cannabinoids. **[Em linha]. Disponível em** < <https://calpoison.org/news/synthetic-cannabinoids> > **[Consultado em 6 maio 2018].**

- Mohamed, K. (2017). One-Step Derivatization-Extraction Method for Rapid Analysis of Eleven Amphetamines and Cathinones in oral Fluid by GC-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 41, pp.639-645.
- Musshoff et al. (2013). Driving under the influence of synthetic cannabinoids (“Spice”): a case series. *International Journal of Legal Medicine*, 128, pp.59-64.
- Namera, A. et al. (2015). Comprehensive review of the detection methods for synthetic cannabinoids and cathinones. *Forensic Toxicology*, 33, pp.175-194.
- Newsweek. (2017). Synthetic marijuana is a legal drug with a growing trail of overdoses and no studies – until now. [Em linha] Disponível em <<http://www.newsweek.com/synthetic-marijuana-legal-drug-growing-trail-overdoses-and-no-studies-until-719049>> [Consultado em 10 abril 2018].
- Niaz, K. et al. (2017). Endo-cannabinoids system and the toxicity of cannabinoids with a biotechnological approach. *EXCLI Journal*, 16, pp.688-711.
- OEDT (2017). Perspetivas sobre drogas – Os canabinóides sintéticos na Europa. [Em linha] (Disponível em <http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2753/Synthetic%20cannabinoids_2017_PT.pdf> [Consultado em 9 janeiro 2018].
- OEDT (2017). Synthetic Cannabinoids and “Spice” Drug Profile. [Em linha] Disponível em <http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2753/Synthetic%20cannabinoids_2017_PT.pdf> [Consultado em 9 Outubro 2017].
- Pamplona, Fabrício A. (2014). Quais são e pra que servem os medicamentos à base de *Cannabis*? *Revista da Biologia*, 13, pp.28-35.
- Patton, A. L. et al., K2 toxicity: fatal case of psychiatric complications following AM2201 exposure. *Journal of Forensic Science*, 58, pp. 1676-1680.
- Pélissier-Alicot, A. et al. (2003). Mechanisms Underlying Postmortem Redistribution of Drugs: A Review. *Journal of Analytical Toxicology*, 27, pp.533-544.
- Pertwee, R. (2006). Cannabinoids Receptor Ligands. *TOCRIS bioscience*, 27.
- Peters F. (2007). Stability of analytes in biosamples – an important issue in clinical and forensic toxicology? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 388, pp.1505-1519.
- Pintori, N., Loi, B. e Mereu, M. (2017). Synthetic cannabinoids: the hidden side of Spice drugs. *Behavioural Pharmacology*, 28, pp.409-419.

- Pon, D. e Fenyvesi, I. (2018). A Validated Method for the Detection and Quantification of Synthetic Cannabinoids in Whole Blood and Urine, and its Application to Postmortem Cases in Johannesburg, South Africa. *South African Journal of Chemistry*, 71, pp.24-29.
- Pourmand, A. et al. (2017). Designer drugs: Review and implications for emergency management. *Human & Experimental Toxicology*, 37, pp.94-101.
- Presley, B. et al. (2016). Metabolism and Toxicological Analysis of Synthetic Cannabinoids in Biological Fluids and Tissues, *Forensic Science Review*, 28, pp.103-169.
- Ramlugon, S., Levendal, R. e Frost, C. (2018). Time-dependent effect of phytocannabinoid treatments in fat cells. *Phytotherapy Research*.
- Ramos, R., Valente, I. e Rodrigues J. (2014). Analysis of biogenic amines in wines by salting out assisted liquid extraction and high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Talanta*, 124, pp.146-151.
- Reggio, P. (2005). Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Ligand-Ligand and Ligand-Receptor Modeling Approaches. In: Pertwee, R. *Cannabinoids*, 168, pp.247-282.
- Reggio, P. (2002). Endocannabinoid structure-activity relationships for interaction at the cannabinoid receptors. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 66, pp-143-160.
- Rojek, S. et al. (2017). A new challenge in forensic toxicology exemplified by a case of murder under the influence of a synthetic cannabinoid – AM-2201. *Legal Medicine*, 27, pp. 25-31.
- Sempio, C. et al. (2017). Optimization of recombinant β -glucuronidase hydrolysis and quantification of eight urinary cannabinoids and metabolites by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Drug Test and Analysis*, 10, pp.518-529.
- Schneir, A., Cullen, J. e Ly, B. (2011). “Spice” Girls: Synthetic Cannabinoid Intoxication. *The Journal of Emergency Medicine*, 40, pp.296-299.
- Scocard, A. et al. (2016). Cannabinoïdes de synthèse: une nouvelle matrice des addictions. *La Presse Médicale*, 46, pp.11-22.

- Shanks, K., Dahn, T. e Terrell, A. (2012). Detection of JWH-018 and JWH-073 by UPLC-MS-MS in Postmortem Whole Blood Casework. *Journal of Analytical Toxicology*, 36, pp.145-152.
- Sobolevsky, T., Prasolov, I. e Rodchenkov, G. (2010). Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine. *Forensic Science International*, 200, pp.141-147.
- Spaderna, M., Addy, P. e D'Souza, D. (2013). Spicing things up: synthetic cannabinoids. *Psychopharmacology*, 228, pp.525-540.
- Starowicz, K. e Finn, D. (2017). Cannabinoids and pain: Sites and Mechanisms of Action. *Cannabinoid Pharmacology*, pp.437-475.
- Sugiura, T. (2008). Biosynthesis of Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol. In: Kofalvi, A. *Cannabinoids and the brain*. New York, Springer.
- Tai, S. e Fantegrossi, W. (2016). Pharmacological and Toxicological Effects of Synthetic Cannabinoids and Their Metabolites. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 32, pp.249-262.
- Tang, Y. e Weng, N. (2013). Salting-out assisted liquid–liquid extraction for bioanalysis, *Bioanalysis*, 5, pp.1583-1598.
- Teixeira, H. (2015). Canabinóides. In: Dinis-Oliveira, R., Carvalho, F. e Bastos, M. *Toxicologia forense*. Lisboa, Pactor, Edições de Ciências Sociais, Forenses e da Educação, pp.187-199.
- UNODC (2011). Synthetic Cannabinoids in Herbal Products. **Disponível em** <https://www.unodc.org/documents/scientific/Synthetic_Cannabinoids.pdf> **[Consultado em 11 janeiro 2018]**
- Zaami, S. et al. (2018). Medical use of cannabis: Italian and European legislation. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22, pp.1161-1167.
- Zaitsev et al. (2015). High-resolution mass spectrometric determination of the synthetic cannabinoids MAM-2201, AM-2201, AM-2232, and their metabolites in postmortem plasma and urine by LC/Q-TOFMS. *International Journal of Legal Medicine*, 129, pp.1233-1245.
- Znaleziona, J. et al. (2015). Determination and identification of synthetic cannabinoids and their metabolites in different matrices by modern analytical techniques – a review. *Analytica Chimica Acta*, 874, pp.11-25.